

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/EP00/05258

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 28 December 2000 (28.12.00)	
International application No.: PCT/EP00/05258	Applicant's or agent's file reference: 0050/050061
International filing date: 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date: 17 June 1999 (17.06.99)
Applicant: RADEMACHER, Wilhelm et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
26 August 2000 (26.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

wa /

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050061	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 05258	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17/06/1999
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG VOM GEHALT AN FLAVONOIDEN UND PHENOLISCHEN INHALTS-STOFFEN IN PFLANZEN

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A01N37/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROEMMELT, S. ET AL: "Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple respect to plant resistance against fire blight" ACTA HORTIC. (1999), 489(EIGHTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON FIRE BLIGHT, 19, Seiten 359-363, XP000917326 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-6
X	RADEMACHER, WILHELM: "Inhibitors of gibberellin biosynthesis: Prohexadione-Ca, a new plant grow regulator for apple with interesting biochemical features" RIKEN REV., Nr. 21, April 1999 (1999-04), Seiten 11-12, XP000917297 das ganze Dokument --- -/-	1-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bertrand, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 598 404 A (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO) 25. Mai 1994 (1994-05-25) das ganze Dokument ---	1-6
Y	FR 2 767 533 A (PASQUALE GERARD DI) 26. Februar 1999 (1999-02-26) das ganze Dokument -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05258

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0598404	A	25-05-1994	JP 6157209 A	03-06-1994
			AT 169178 T	15-08-1998
			BR 9304763 A	24-05-1994
			CA 2103093 A	20-05-1994
			CN 1086955 A	25-05-1994
			DE 69320148 D	10-09-1998
			DE 69320148 T	10-12-1998
			ES 2119849 T	16-10-1998
			KR 172618 B	01-02-1999
			LT 1453 A, B	15-06-1994
			RU 2129370 C	27-04-1999
			US 5436225 A	25-07-1995
			US 5510321 A	23-04-1996
<hr/>				
FR 2767533	A	26-02-1999	NONE	
<hr/>				

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

Patente, Marken u. Lizenzen
21. AUG. 2000

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 23/08/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
0050/050061

WEITERES VORGEHEN siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05258

Internationales Anmeldedatum
(Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000

Anmelder

BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüros des Internationalen Büros übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis 90.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüros vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswählerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heike Zoglauer

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050061	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/05258	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17/06/1999
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG VOM GEHALT AN FLAVONOIDEN UND PHENOLISCHEN INHALTS-
STOFFEN IN PFLANZEN**

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A01N37/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROEMMELT, S. ET AL: "Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple respect to plant resistance against fire blight" ACTA HORTIC. (1999), 489(EIGHTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON FIRE BLIGHT, 19, Seiten 359-363, XP000917326 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-6
X	RADEMACHER, WILHELM: "Inhibitors of gibberellin biosynthesis: Prohexadione-Ca, a new plant grow regulator for apple with interesting biochemical features" RIKEN REV., Nr. 21, April 1999 (1999-04), Seiten 11-12, XP000917297 das ganze Dokument --- -/--	1-6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bertrand, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 598 404 A (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO) 25. Mai 1994 (1994-05-25) das ganze Dokument ---	1-6
Y	FR 2 767 533 A (PASQUALE GERARD DI) 26. Februar 1999 (1999-02-26) das ganze Dokument -----	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05258

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0598404 A	25-05-1994	JP 6157209 A	03-06-1994
		AT 169178 T	15-08-1998
		BR 9304763 A	24-05-1994
		CA 2103093 A	20-05-1994
		CN 1086955 A	25-05-1994
		DE 69320148 D	10-09-1998
		DE 69320148 T	10-12-1998
		ES 2119849 T	16-10-1998
		KR 172618 B	01-02-1999
		LT 1453 A,B	15-06-1994
		RU 2129370 C	27-04-1999
		US 5436225 A	25-07-1995
		US 5510321 A	23-04-1996
FR 2767533 A	26-02-1999	KEINE	

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

9

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0050/050061	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05258	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01N 37/42		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 26 August 2000 (26.08.00)	Date of completion of this report 11 April 2001 (11.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05258

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-13, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-6, filed with the letter of 09 March 2001 (09.03.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

The documents cited in this report are numbered in the order of their appearance in the international search report.

The amendments submitted with the telefax of 9 March 2001 comply with PCT Article 34(2) and hence are admissible.

Although D1 was published between the priority date and the date of application, D1 complies with the contents of a lecture mentioned in the application (see page 5, lines 42-44) which was given before the priority date. Thus D1 is part of the prior art according to PCT Rule 64.1-64.3.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/05258

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The present invention concerns a process for increasing the flavonoid content in certain plants, the use of these plants, and the agents that can be thereby produced.

D1 describes consequences, especially for flavonoids, of the treatment of apple with prohexadione-Ca: the corresponding content increases. A similar teaching results from D2. D3 describes compounds according to a formula that comprises the present Formula (I) for regulation of plant growth.

As the applicant has remarked in the present description, flavonoids are of particular interest in the health field, for instance. Additionally, it is common to extract flavonoids from plants or to use plant extracts containing said flavonoids (see D4, for example). It is highly improbable that the effect achieved using acylcyclohexadiones could only be obtained with apples. Therefore, a person skilled in the art would have expected that effect with other plants as well or would have at least been prompted to carry out corresponding trials.

Hence, the present application satisfies the criteria cited in PCT Article 33(2) because the subject matter of

Claims 1-6 is novel in light of the prior art as defined in the Regulations (PCT Rule 64.1-64.3). Nonetheless, the present application does not satisfy the requirement cited in PCT Article 33(3) because the subject matter of Claims 1-6 does not involve an inventive step (PCT Rule 65.1-65.2). The present application satisfies the criterion cited in PCT Article 33(4) because the subject matter of Claims 1-6 is considered to be industrially applicable.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/05258

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

There is an obvious error in Formula (I) throughout the application.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/050061	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05258	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 17/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A01N37/42		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 26/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.04.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Bertrand, F Tel. Nr. +49 89 2399 8606 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-13 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-6 mit Telefax vom 09/03/2001 ✓

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05258

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-6
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-6
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-6
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die in diesem Bescheid zitierten Dokumente werden in derselben Reihenfolge numeriert wie sie im internationalen Recherchenbericht erscheinen.

Die mit Telefax vom 09.03.2001 eingereichten Änderungen verstoßen nicht gegen Artikel 34(2)PCT und sind daher zulässig.

D1 wurde zwar zwischen dem Prioritätsdatum und dem Anmeldedatum veröffentlicht, jedoch entspricht D1 dem Inhalt eines in der Anmeldung (siehe Seite 5, Zeilen 42-44) erwähnten Vortrag, der vor dem Prioritätsdatum statt gefunden hat. D1 gehört somit zum Stand der Technik gemäß Regel 64.1-64.3 PCT.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden in bestimmten Pflanzen, die Verwendung dieser Pflanzen sowie die Mittel die dadurch hergestellt werden können.

D1 beschreibt Folgen der Behandlung von Apfel mit Prohexadione-Ca besonders auf Flavonoide: eine Erhöhung des entsprechenden Gehalts wird festgestellt. Eine ähnliche Lehre ergibt sich aus D2. D3 beschreibt Verbindungen gemäß einer Formel, die die vorliegende Formel (I) umfaßt, zur Pflanzenwachstumsregulierung.

Wie es der Anmelder selbst in der vorliegenden Beschreibung bemerkt, sind Flavonoide z.B. im Bereich der Gesundheit von besonderem Interesse. Es ist andererseits üblich diese Flavonoide aus Pflanzen zu gewinnen, oder Pflanzenextrakte zu verwenden, die diese Flavonoide enthalten (siehe z.B. D4). Es ist kaum glaubhaft, daß der durch die Verwendung von Acylcyclohexadionen erzielte Effekt ausschließlich auf Apfel ausgeübt sein kann. Deshalb hätte der Fachmann diesen Effekt auch bei anderen Pflanzen erwartet oder hätte zumindest einen Anlaß gehabt, die entsprechende Versuche auszuführen.

Somit erfüllt die vorliegende Anmeldung das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-6 im Hinblick auf den in der Ausführungsordnung umschriebene Stand der Technik (Regel 64.1-64.3 PCT) neu ist. Jedoch erfüllt die vorliegende Anmeldung das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-6 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Regel 65.1-65.2 PCT). Die vorliegende Anmeldung erfüllt das in Artikel 33(4) PCT genannte Kriterium, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-6 als gewerblich anwendbar betrachtet wird.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

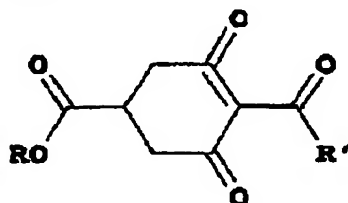
In der gesamten Anmeldung liegt ein offensichtlicher Fehler in Formel (I) vor.

1

Neue Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung und qualitativen Veränderung des
 5 Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in
 Weinreben, Kirsche, Pflaume, Schlehe, Blaubeere, Erdbeere,
 Zitrusfrüchten, Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grün-
 kohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch,
 Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen,
 10 Roggen, *Aronia melanocarpa* oder *Ginkgo biloba*, dadurch ge-
 kennzeichnet, daß die Pflanzen mit einem Acylcyclohexadion
 der Formel I

15

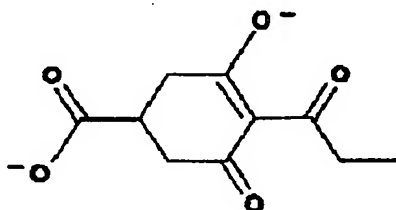


I,

- 20 wobei R für Wasserstoff oder C₁-C₆-Alkyl und R' für C₁-C₆-Al-
 kyl oder C₃-C₆-Cycloalkyl stehen, oder einem geeigneten Salz
 von I, behandelt werden.

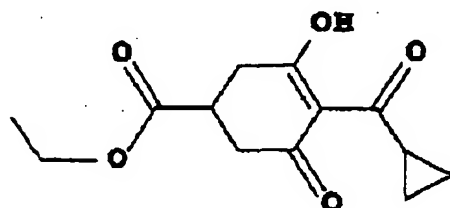
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Pflanzen mit einem Acyl-
 25 cyclohexadion der Formel II und/oder Formel III

30

Ca⁺⁺

II

35



III

- 40 behandelt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
 der Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in
 Weinreben erhöht und qualitativ verändert wird.

45

2

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt an Flavonoiden mit unsubstituiertem C-Atom in 3-Position, sowie deren Oligomeren und Polymeren erhöht wird.
- 5 5. Verwendung von Weinrebe, Kirsche, Pflaume, Schlehe, Blaubeere, Erdbeere, Zitrusfrüchten, Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, *Aronia melanocarpa* oder *Ginkgo biloba*,
10 die mit einem Acylcyclohexadion gemäß Anspruch 1 oder 2 behandelt wurden, von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und
15 Tier sowie von Kosmetika.
6. Extrakte, Säfte, Weine oder Preßrückstände mit erhöhtem und qualitativ verändertem Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen, erhältlich aus Trauben von Wein-
20 pflanzen einer roten Sorte, wobei die Weinpflanzen vorher mit mindestens einem Acylcyclohexadion der Formel I, II oder III gemäß Anspruch 1 oder 2 behandelt wurden.

25

30

35

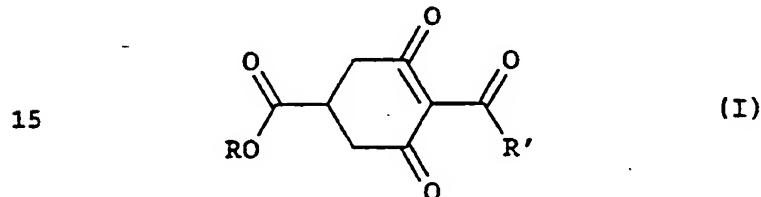
40

45

VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG VOM GEHALT AN FLAVONOIDEN UND PHENOLISCHEN INHALTSSTOFFEN IN PFLANZEN

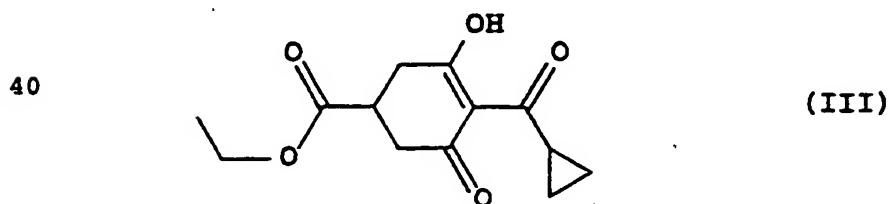
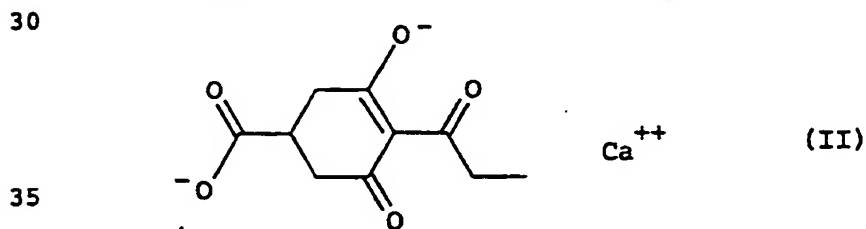
5 Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze mit
 10 wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen der Formel I behandelt werden,



wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-,
 20 C₁-C₆-Haloalkyl-, C₂-C₁₀-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienylmethyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete
 25 Salze dieser Verbindungen.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Erhöhung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(II) und/oder Trinexapac-ethyl(III) hervorgerufen werden.



45 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Acylcyclohexadionen der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder mit Trinexapac-

ethyl behandelt wurden oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.

- Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mittel, hergestellt nach den erfindungsgemäßen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.
- Verschiedene phenolische Substanzen (Phenylpropanoide) kommen in Pflanzen vor, z. B. Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, Gallussäure, Eugenol, Lignane, Cumarine, Lignin, Stilbene (Polydatin, Resveratrol), Flavonoide (Flavone, Catechine, Flavanone, Anthocyanidine, Isoflavone), polymethoxylierte Flavone. Demgemäß sind Phenole auch genereller Bestandteil vieler pflanzlicher Nahrungs- und Genußmittel. Bestimmte phenolische Substanzen sind von besonderer Bedeutung, da sie nach Aufnahme mit der Nahrung im menschlichen oder tierischen Stoffwechsel eine antioxidative Wirkung ausüben können (Baum, B. O.; Perun, A. L. Antioxidant efficiency versus structure. *Soc. Plast. Engrs Trans* 2: 250-257, (1962); Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Duthie, G.G. Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J. Sci. Food Agric.* 76: 257-262, (1997); Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Pananga, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956, (1996); Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. Polyphenolic flavonoids as scavenger of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339-346, (1995); Stryer, L. *Biochemistry* S. Francisco: Freeman, (1975); Vieira, O.; Escargueil-Blanc, I.; Meilhac, O.; Basile, J. P.; Laranjinha, J.; Almeida, L.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 123: 565-573, (1998)). Darüber hinaus haben Polyphenole vielfältige Wirkungen auf den Zellstoffwechsel. Unter anderem werden Enzyme der Signaltransduction wie Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase und Phosphatidylinositol-3-kinase moduliert (Agullo, G.; Gamet-payraastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Remesy, C.; Chap, H.; Payraastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a compari-

- son with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53 :1649-1657, (1997); Ferriola, P. C.; Cody, V.; Middleton, E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure activity relationship. *Biochem Pharmacol* 38: 1617-1624, (1989); Cushman, M.; Nagarathman, D.; Burg, D. L.; Geahlen, R. L. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of flavonoids analogues. *J Med Chem* 34: 798-806, (1991); Hagiwara, M.; Inoue, S.; Tanaka, T.; Nunoki, K.; Ito, M.; Hidaka, H. Differential effects of flavonoids as
- 10 inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonin protein kinases. *Biochem Pharmacol* 37: 2987-2992, (1988)), -die induzierbare NO-Synthase downreguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage
- 15 cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53: 897-903, (1997)) und die Genexpression von z. B. Interleukinen und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) reguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell
- 20 line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53:897-903, (1997); Wolle, J.; Hill, R. R.; Ferguson, E.; Devall, L. J.; Trivedi, B. K.; Newton, R. S.; Saxena, U. Selective inhibition of Tumor necrosis Factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcriptional factor NF- κ B.
- 25 *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 16: 1501-1508, (1996)). Es gilt als gesichert, daß diese Wirkungen positiv sind zur Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes, verschiedener Tumorarten und weiterer chronischer Krankheiten (Bertuglia, S.; Malandrino, S.; Colantuoni, A. Effects of the natural flavonoid delphinidin
- 30 on diabetic microangiopathy. *Arznei-Forsch/Drug Res* 45: 481-485, (1995); Griffiths, K.; Adlercreutz, H.; Boyle, P.; Denis, L.; Nicholson, R.I.; Morton, M.S. *Nutrition and Cancer Oxford*: Isis Medical Media, (1996); Hertog, M. G. L.; Fesrens, E. J. M.; Hollman, P. C. K.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant
- 35 flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342: 1007-1011, (1993); Kapiotis, S.; Hermann, M.; Held, I.; Seelos, C.; Ehringer, H.; Gmeiner, B. M. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-74, (1997);
- 40 Stampfer, M. J.; Hennekens, C. H.; Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Rosner, B.; Willet, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New Engl J Med* 328 :1444-1449, (1993); Tijburg, L. B. M.; Mattern, T.; Folts, J. D.; Weisgerber, U. M.; Katan, M. B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 771-785, (1997); Kirk, E. A.; Sutherland, P.; Wang, S. A.; Chait, A.; LeBoeuf, R. C. Dietary

- isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128: 954-9, (1998)). Aus geeigneten Pflanzen wird daher bereits eine Reihe von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln gewonnen, deren Wirkung auf ihrem Gehalt an phenolischen Substanzen beruht (Gerritsen, M. E.; Carley, W. W.; Ranges, G. E.; Shen, C. P.; Phan, S. A.; Ligon, G. F.; Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278-292, (1995); Lin, J. K.; Chen, Y. C.; Huang, Y. T.; Lin-Shiau, S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 28-29:39-48, 1997; Zi, X.; Mukhtar, H.; Agarwal, R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. *Biochem Biophys Res Comm* 239:334-339, 1997). Bekannt ist weiterhin, daß bestimmte pflanzliche Nahrungsmittel oder aus ihnen hergestellte Genußmittel eine positive Wirkung gegen verschiedene Krankheiten ausüben. Das in Weißwein, besonders aber in Rotwein, enthaltene Resveratrol (nebst weiterer Komponenten) wirkt beispielsweise gegen kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Gehm, B.D.; McAndrews, J.M.; Chien, P.-Y.; Jameson, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143, (1997); Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehtha, R.G.; Moon, R.C., Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, (1997)). Eine ähnliche Wirkung weisen auch Substanzen wie Catechin, Epicatechin-3-gallat, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-gallat auf, die in Blättern von Tee (*Camellia sinensis*) vorkommen. Insbesondere aus nicht-fermentierten Teeblättern (Grüner Tee) hergestellte Getränke sind von positiver gesundheitlicher Relevanz (Hu, G.; Han, C.; Chen, J. Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallocatechin gallate in mice. *Nutr Cancer* 24: 203-209; (1995); Scholz, E; Bertram, B. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Der Teestrauch. *Z. Phytotherapie* 17: 235-250, (1995); Yu, R.; Jiao, J. J.; Duh, J. L.; Gudehithlu, K.; Tan, T. H.; Kong, A. N. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant responsive elements-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 18: 451-456, (1997); Jankun, J.; Selman, S.H.; Swiercz, R. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387: 561, (1997)). Darüber hinaus weisen auch polymethoxylierte Flavone aus Zitrusfrüchten eine potentielle antitumorale Wirkung auf (Chem,

J.; Montanari, A.M.; Widmer, W.W. Two new polymethoxylierte flavone, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids. *J Agric Food Chem* 45: 364-368, (1997)).

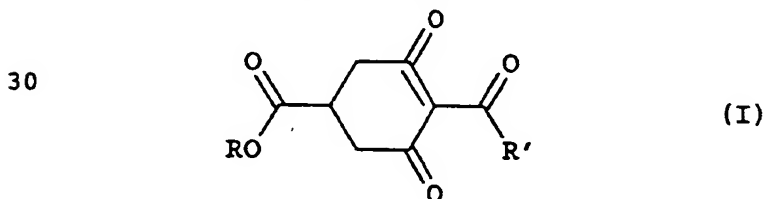
- 5 Acylcyclohexadione wie Prohexadion-Ca und Trinexapac-ethyl (ältere Bezeichnung: Cimectacarb) werden als Bioregulatoren zur Hemmung des pflanzlichen Längenwachstums eingesetzt. Ihre bioregulatorische Wirkung kommt dadurch zustande, daß sie die Biosynthese von längenwachstumsfördernden Gibberellinen blockieren. Dabei hemmen sie aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu 2-Oxoglutarsäure bestimmte Dioxygenasen, die 2-Oxoglutarsäure als Co-Substrat benötigen (Rademacher, W, Biochemical effects of plant growth retardants, in: Plant Biochemical Regulators, Gausman, HW (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-200 (1991)). Es ist bekannt, daß derartige Verbindungen auch in den Stoffwechsel von Phenolen eingreifen und so bei mehreren Pflanzenarten eine Hemmung der Anthocyanbildung bewirken können (Rademacher, W et al., The mode of action of acylcyclohexanediones - a new type of growth retardant, in: Progress in Plant Growth Regulation, Karssen, CM, van Loon, LC, Vreugdenhil, D (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992)). Derartige Effekte auf den Haushalt phenolischer Inhaltsstoffe werden als ursächlich für die Nebenwirkung von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand angegeben (Rademacher, W et al., Prohexadione-Ca - a new plant growth regulator for apple with interesting biochemical features, Poster auf dem 25th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, 7.-10. Juli 1998, Chicago). A. Lux-Endrich (Dissertation Technische Universität München in Weihenstephan, 1998) findet im Verlauf ihrer Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand, daß es in Zellkulturen von Apfel durch Prohexadion-Ca zu einer mehrfachen Erhöhung des Gehaltes an phenolischen Substanzen kommt und daß dabei eine Reihe von sonst nicht vorhandenen Phenolen auftritt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde weiterhin gefunden, daß unter dem Einfluß von Prohexadion-Ca relativ hohe Mengen von Luteoliflavan und Eriodyctiol in Sproßgewebe von Apfel auftreten. Luteoliflavan kommt in Apfelgewebe normalerweise nicht vor und Eriodyctiol tritt als Intermediat des Flavonoidstoffwechsels nur in geringen Mengen auf. Die zu erwartenden Flavonoide Catechin und Cyanidin waren im behandelten Gewebe jedoch nicht nachweisbar oder traten nur in deutlich reduzierten Mengen auf (S. Römmelt et al, Vortrag 8th International Workshop on Fire Blight, Kusadasi, Türkei, 12.-15. Oktober 1998).

45.

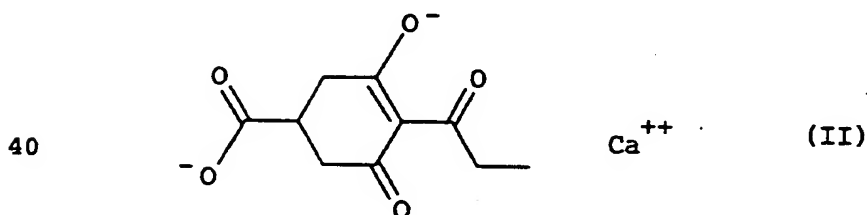
Es kann als gesichert gelten, daß Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und andere Acylcyclohexadione 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen inhibieren, die im Stoffwechsel phenolischer Substanzen von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich primär um Chalconsynthetase (CHS) und um Flavanon-3-hydroxylase (F3H) (W. Heller und G. Forkmann, Biosynthesis, in: The Flavonoids, Harborne, JB (ed.), Chapman and Hall, New York, 1988). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Acylcyclohexadione auch weitere, bislang unbekannte, 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen hemmen. Es dürfte ferner naheliegend sein, daß ein Mangel an Catechin, Cyanidin oder anderen Endprodukten der Flavonoidsynthese von der Pflanze registriert wird und daß über einen Feedback-Mechanismus die Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) erhöht wird. Durch die weiterhin existierende Hemmung von CHS und F3H können diese Flavonoid-Endprodukte jedoch nicht gebildet werden, und es kommt zu einer vermehrten Bildung von Luteoliflavan, Eriodyctiol und anderer Phenole (Abbildung 1).

20 Aufgabe der Erfindung war es ein kostengünstiges, einfaches Verfahren zu entwickeln, um den Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen in Pflanzen zu erhöhen und um deren gesundheitsfördernden Eigenschaften zu verbessern.

25 Die Aufgabe konnte überraschenderweise durch Behandlung der Pflanzen mit den wachstumsregulierenden Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione(I)



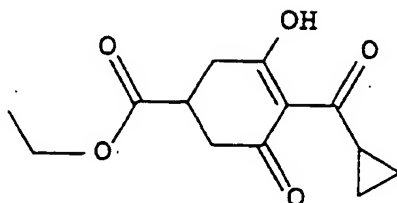
35 und vor allem mit den Verbindungen Prohexadion-Ca(II)



45

und Trihexapac-ethyl(III)

5



(III)

erreicht werden.

10

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) können die Flavonoide Eriodictyol, Proanthocyanidine, die am C-Atom 3 mit Wasserstoff substituiert sind, z.B. Luteoforol, Luteoliflavan, Apigeniflavan und Tricetiflavan, sowie homogene und heterogene Oligomere und Polymere aus den genannten und strukturell verwandten Substanzen vermehrt gebildet werden.

15

Erhöhte Konzentrationen der Phenole Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Salicylsäure oder Umbelliferon, einschließlich der aus ihnen gebildeten homogenen und heterogenen Oligomere und Polymere können nach Applikation der Verbindungen Acylcyclohexadion der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trihexapac-ethyl(III) auf Pflanzen festgestellt werden.

25

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) wird auch die Konzentration der Glykoside der Flavonoide, der phenolischen Verbindungen, der Chalcone und der Stilbene in den Pflanzen erhöht.

30

Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und verwandte Verbindungen greifen auch in weitere Stoffwechselreaktionen ein, bei denen bislang allenfalls vermutet werden kann, daß 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen beteiligt sind.

35

Als weitere zusätzlich positive Wirkung bei der Gewinnung von Präparaten aus höheren Pflanzen mit verbesserter heilender, gesundheitsfördernder oder stärkender Wirkung ist zu vermerken, daß sich aufgrund der wachstumsregulierenden Wirkung von Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl oder verwandter Acylcyclohexandione ein Konzentrierungseffekt der relevanten Inhaltsstoffe im biologischen Material ergibt.

40

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen durch Behandlung der Pflanzen mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione

45

- der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl, kann erfolgreich bei folgenden Pflanzen angewendet werden, wobei auch Pflanzen, die nicht genannt sind, erfolgreich behandelt werden können: Weinrebe, Kirsche, Pflaume, Schlehe, Blaubeere, Erdbeere, Zitrusfrüchte (wie Orange, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, Aronia melanocarpa, Ginkgo biloba.
- 10 Pflanzen, die mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione; speziell Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl, behandelt wurden zur Steigerung des Gehältes an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen, oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) können zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika verwendet werden.

- Aus den erfindungsgemäß behandelten Pflanzen können auch Mittel hergestellt werden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.

- Es wurde nun überraschend gefunden, daß unter dem Einfluß von mit Acylcyclohexadionen der Formel I, Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl behandelten Pflanzen oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellter Produkte (Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte, Säfte etc.)

- (1) die Antioxidative Kapazität *in vitro* (Electron Spin Resonance (ESR), LDL-Oxidation, Total Antioxidant Capacity, NO-Scavenging) verbessert wird;
- (2) eine modulierende Wirkung auf Enzyme, vor allem Enzyme der Signaltransduktion (Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase) auftritt;
- (3) eine Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren (NF-kB, AP-1) in Endothelzellen, Lymphocyten und glatten Muskelzellen induziert wird;

- (4) die Regulation der Genexpression von Targetgenen involviert in die Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen (Cytokine IL-1 und IL-8, *macrophage chemoattractant protein 1* (MCP-1), Adhensionsfaktoren ICAM-1 und VCAM-1) moduliert wird;
- 5 (5) eine antiaggregatorische Wirkung induziert wird;
- (6) die Cholesterinsynthese in Hepatocyten gehemmt wird;
- 10 (7) antiproliferative/antineoplastische Effekte bestehen.

Beispiel 1

Steigerung des Gehaltes an Eriodictyol und Luteoliflavan an jungen Apfelblättern nach Behandlung mit Prohexadion-Ca

Apfelpflanzen der Sorte "Weirouge" wurden unter Klimakammer-Bedingungen kultiviert und mit 250 ppm an Prohexadion-Ca (formuliert als BAS 125 10 W = 10 %iges benetzbares Granulat) bis

20 tropfnaß behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde von den einzelnen Trieben das jeweils jüngste vollentwickelte Blatt geerntet. Die gefriergetrockneten und gemörserten Blätter wurden mit Methanol extrahiert. Aus dem konzentrierten Extrakt wurden Flavonoide und verwandte Verbindungen durch HPLC

25 analysiert. Die Auftrennung erfolgte dabei an Hypersil ODS (3 µm Partikelgröße) auf einer Säule von 250 x 4 mm. Die Elution erfolgte bei einer Fließrate von 0,5 ml pro Minute, wobei Mischungen aus Ameisensäure (5 %ig in Wasser) und Methanol, schrittweise im Verhältnis von 95 : 5 bis 10 : 90 (v/v) gesteuert, verwendet wurden. Phenolische Säuren und Flavonole wurden bei 280 nm detektiert. Flavan-3-ole wurden nach Nachsäulenderivatisierung mit p-Dimethylaminozimtaldehyd bei 640 nm bestimmt. Methodische Details bei Treutter et al. (1994), Journal of

30 Chromatography A 667, 290 - 297.

35

Das Ergebnis ist in folgender Tabelle dargestellt:

Blätter, die mit Prohexadion-Ca behandelt wurden zeigen eine deutliche Erhöhung der Eriodictyol-Konzentration nach 12 bzw. 21

40 Tagen.

45

Behandlung	Eriodictyol [g/kg Trockenmasse]		Luteoliflavan [g/kg Trockenmasse]	
	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.
5 Kontrolle	0	1	0	70
250 ppm Prohexadion- Ca	17	27	0	34

10 Beispiel 2

Herstellung von Probenmaterialien aus behandelten und unbehandelten Dornfelder-Trauben

15 Rebstöcke der Sorte "Dornfelder" wurden zweimal zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Formulierung BAS 125 10W, enthaltend Prohexadion-Ca behandelt. Je Behandlung wurden 1000 g Prohexadion-Ca in 1000 l Spritzbrühe pro ha appliziert.

20 Die 1. Ausbringung erfolgte im Entwicklungsstadium 73 noch vor Beginn der Beerenanfärbung, die 2. Ausbringung 10 Tage später.

Bei der Ernte wiesen die unbehandelten und die behandelten Trauben einer ähnlichen Reifegrad auf. Kontrolle unbehandelt: 69°C Oe;
25 7,3 g/l Säurebehandelt: 67° Oe; 7,4 g/l Säure.

Die behandelten Trauben waren geringer pigmentiert. Geschmacklich war kein Unterschied feststellbar.

30 Der Weinausbau erfolgte nach gängigen Methoden als Rotwein, d.h. zur besseren Pigmentextraktion stand der Most längere Zeit auf der Maische.

Nach Gefriertrocknung des trübungsfreien Weins wurden aus 100 ml
35 unbehandeltem Wein ca. 2,5 g sirupartiger Rückstand und aus dem mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken gewonnenen Wein ca. 2,1 g sirupartiger Rückstand gewonnen.

Beispiel 3

40

Hemmung der Cholesterinbiosynthese in Kulturen primärer Rattenhepatocyten durch Prohexadion-Ca behandelten Dornfelder Wein

45

Herstellung der Stammlösungen

Vom Lyophilisat der unbehandelten und behandelten Dornfelder Weine wurde eine Menge zwischen 10 und 20 mg exakt abgewogen und
5 mit soviel DMSO versetzt, daß eine Stammlösung von 10 mM Gesamtflavonoide entstand. Von diesen Stammlösungen wurden unmittelbar vor Testbeginn Verdünnungen im Kulturmedium hergestellt. Die Verdünnungen erfolgten in 10er Schritten zwischen 10^{-4} und 10^{-6} M.

10 Herstellung der Hepatocytenkulturen

Primäre Hepatocyten wurden aus den Lebern von männlichen Sprague-Dawley Ratten (240-290 g) mittels Collagenase-Perfusion gewonnen (Gebhardt et al., Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 41: 800 - 804
15 (1991) - 1990). Die Kultivierung erfolgte in Collagen-beschichteten Petrischalen (6-well Plates, Greiner, Nürtingen) mit einer Zelldichte von 125.000 Zellen/cm² in Williams Medium E mit 10 % Kälberserum. Nähere Angaben insbesondere zum Kulturmedium finden sich bei Gebhardt et al., Cell Biol. Toxicol. 6: 369 - 372
20 (1990) und Mewes et al., Cancer Res. 53: 5135 - 5142 (1993). Die Kulturen wurden nach 2 h auf serum-freies Medium mit Zusatz von 0,1 µM Insulin gewechselt. Sie wurden nach weiteren 20 h für die Versuche eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in je drei unabhängigen Kulturen von 2-3 Ratten getestet.

25

Inkubation der Leberzellkulturen mit den Testsubstanzen

Für den Nachweis einer Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese durch die Testsubstanzen wurden die Hepatocytenkulturen insgesamt
30 für 22 h gehalten. Anschließend wurde mit serum-freiem Williams Medium E unter Zusatz von ¹⁴C-Acetat (nur Tracermengen) für 2 h mit den Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei jeder Testserie wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die Methodik ist bei Gebhardt (1991) und Gebhardt, Lipids 28: 613
35 - 619 (1993) detailliert beschrieben. Die Tracermengen von ¹⁴C-Acetat tauschen schnell mit dem intrazellulären Acetyl-CoA Pool aus und ermöglichen deshalb eine störungsfreie Bestimmung des Einbaus von ¹⁴C-Acetat in die Sterolfraction, die zu >90 % aus Cholesterin besteht (Gebhardt, 1993).

40

Analytik zur Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese

Der Einbau von ¹⁴C-Acetat in die Sterolfraction (nicht-verseifbare Lipide) wurde nach Gebhardt (1991) gemessen. Bei der verwendeten
45 Extraktion mittels Extrelut[®]-Säulen (Merck, Darmstadt) wird das ¹⁴C-Acetat (und daraus in geringer Menge entstehende andere niedermolekulare Metabolite) zu mehr als 95 % abgetrennt. Dieser

Test kann vergleichende Angaben über die relative Syntheserate von Cholesterin und Vorläufer-Sterolen unter dem Einfluss von Testsubstanzen machen (Gebhardt, 1993).

5 Visuelle und mikrobielle Überprüfung der Qualität der Hepatocytenkulturen

Alle verwendeten Kulturen wurden vor und nach der Testinkubation visuell am Mikroskop auf Kontamination mit Mikroorganismen und
10 auf die Integrität der Zellmonolayer überprüft. Bei keiner der Proben wurde eine erkennbare Veränderung der Zellmorphologie (insbesondere bei den höheren Konzentrationen) beobachtet. Dies schließt eine Beeinflussung der Testergebnisse durch zytotoxische Wirkungen der Testsubstanzen weitgehend aus.

15

Die bei allen Kulturen routinemäßig durchgeführten Sterilitätstests ergaben keinerlei Hinweise auf eine Kontamination mit Mikroorganismen.

20 Ergebnisse

Der unbehandelte Dornfelder Wein zeigte keinerlei Wirkungen auf die Cholesterinbiosynthese. Dagegen wurde die Cholesterinsynthese durch Proben von mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken herge-
25 stellten Wein signifikant inhibiert. Bei einer Konzentration von 10^{-5} M betrug die Hemmwirkung ca. 60 % und bei 10^{-4} M annähernd 100 %.

Beispiel 4

30

Effekt von Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt (P-Ca) auf die Destruktion von Tumorzellen

Konfluente murine Leukämiezellen (RAW 264.7) und normale Makro-
35 phagen aus dem Peritoneum von Ratten wurden in mit foetalem Kälberserum supplementiertem DMEM-Medium kultiviert. Extrakte von unbehandeltem und mit Prohexadion-Ca behandeltem Wein wurden bis zu einer Dosierung von 200 µg/mL dem Kulturmedium zugesetzt. In Parallelexperimenten wurden 10, 25 und 50 µg/mL Weinextrakt ge-
40 meinsam mit 100 µM H_2O_2 inkubiert.

Weinextrakt von mit Prohexadion-Ca-behandeltem Wein hatte *per se* bis zu einer Dosierung von 200 µg/mL keinen cytotoxischen Effekt auf die untersuchten Zellkulturen. Jedoch verstärkte Prohexadion-
45 Ca-behandelter Extrakt nach Zugabe von H_2O_2 dosisabhängig den Zelltod der Tumorzellen (RAW 264.7). Dies wird in Abbildung 2 durch die Zunahme des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase

(LDH) im Kulturmedium dokumentiert. Keine Erhöhung der cytotoxischen Wirkung von H_2O_2 trat bei den nicht-transformierten Makrophagen auf. Bei der Tumorzelllinie trat eine Akkumulation des Proteins vom Tumorsuppressorgen p53 im Cytoplasma auf, siehe Abbildung 3.

Prohexadion-behandelter Weinextrakt erhöht die H_2O_2 -induzierte Cytotoxizität von Leukämiezellen, ist aber nicht bei normalen Makrophagen wirksam. Dieser für Tumorzellen spezifische Effekt tritt auch bei Cytostatika auf, die über vermehrten oxidativen Stress wirken (z.B. Anthracycline). Der Mechanismus von Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt ist p53-abhängig.

Beispiel 5

15

Effekt von Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt auf die NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen

Die Untersuchung wurde in Cokulturen aus Makrophagen (RAW 264.7) und Endothelzellen (ECV 304) durchgeführt. Dem Kulturmedium der Endothelzellen wurde humanes LDL (Lipoproteine niedriger Dichte) und ruhende bzw. Interferon- γ (IFN- γ)-aktivierte (10 U/mL) Makrophagen zugegeben. Nach 16 h Inkubation wurde die nukleäre Proteinfraction abgetrennt und in elektrophoretischen Mobility Shift Assays die DNA-Bindung (Aktivierung) des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B bestimmt.

Der basale Gehalt in den ruhenden Endothelzellen war typischerweise gering, siehe Abbildung 4. Die Zugabe von LDL hatte eine Aktivierung des NF- κ B zur Folge, die bei aktivierten Makrophagen höher war als bei den ruhenden. Dies entspricht einer physiologischen Oxidation der LDL bei der Atherogenese. Durch die Inkubation mit Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt war die NF- κ B-Aktivierung in allen Fällen erhöht.

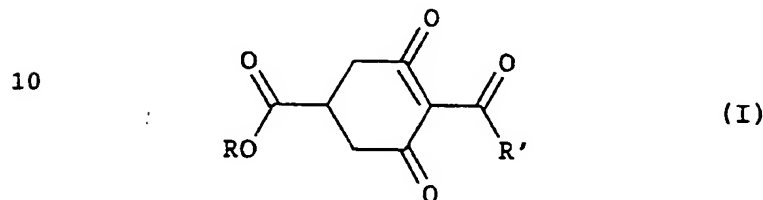
35

Das verwendete Zellkulturmodell ist sehr gut geeignet, die pathophysiologischen/ inflammatorischen Bedingungen in der frühen Phase der Atherosklerose zu beschreiben. Durch den Prohexadion-Ca-behandelten Weinextrakt wird die NF- κ B-Aktivierung verstärkt. Dies kommt der Wirkung eines Biological Response Modifiers gleich; d.h. die Zellantwort auf ein pathophysiologisches Signal wird im positiven Sinne verstärkt.

45

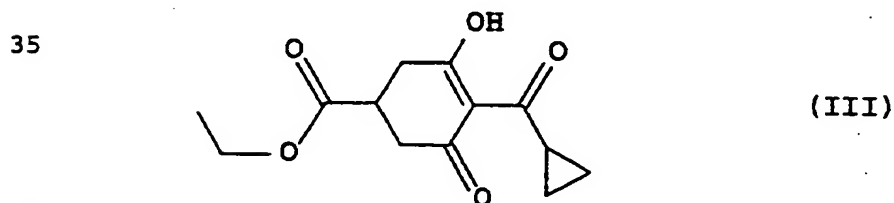
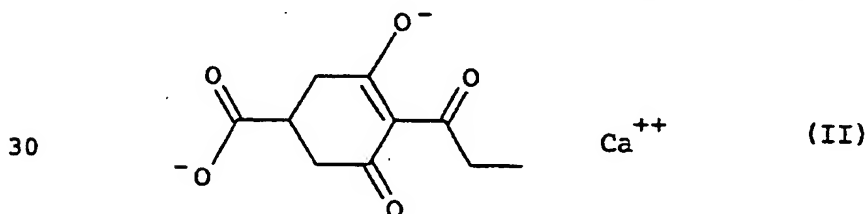
Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und
 5 phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze mit wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen der Formel I behandelt werden,



- 15 wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Haloalkyl-, C₂-C₁₀-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienyl-
 20 methyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete Salze dieser Verbindungen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Erhöhung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(II) und/
 25 oder Trinexapac-ethyl(III) hervorgerufen werden.



3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Pflanzen um Weinrebe, Kirsche, Pflaume, Schlehe, Blaubeere, Erdbeere, Zitrusfrüchte (wie Orange, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl,
 45 Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch,

Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, *Aronia melanocarpa*, *Ginkgo biloba* handelt.

4. Verwendung von Pflanzen gemäß Anspruch 3 oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.
- 10 5. Mittel, hergestellt nach Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist
- 15 und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.
6. Mittel gemäß Anspruch 5, bei denen es sich um Trauben oder Traubenteile, aus ihnen gewonnene Säfte, Weine oder Preßrückstände handelt oder um Extrakte aus den vorgenannten Trauben, Traubenteilen oder Traubenprodukten.

25

30

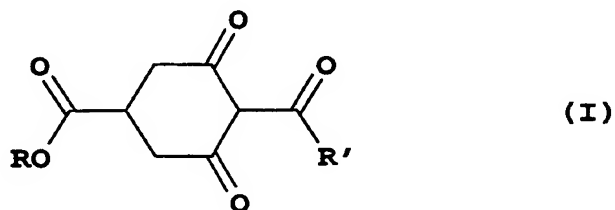
35

40

45

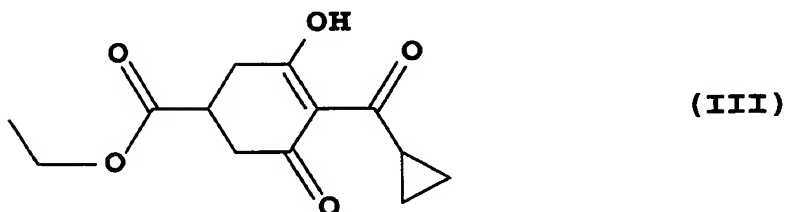
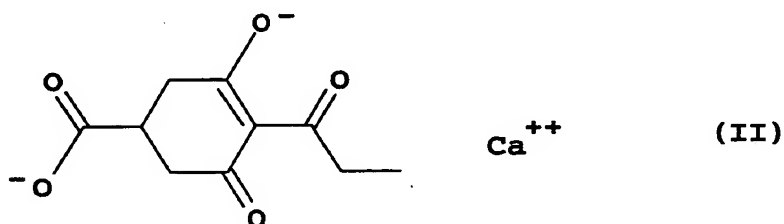
We claim:

1. A method of increasing the content of flavonoids and phenolic constituents in plants, wherein the plants are treated with growth-regulating acylcyclohexanediones of the formula I



- where R is, in particular, hydrogen, C₁-C₆-alkyl, C₁-C₆-haloalkyl, C₂-C₁₀-alkylthioalkyl or phenyl (substituted or unsubstituted) and R' is hydrogen, C₁-C₆-alkyl, C₃-C₆-cycloalkyl, benzyl (substituted or unsubstituted), phenylethyl, phenoxyethyl, 2-thienylmethyl, alkoxymethyl or alkylthiomethyl, and suitable salts of these compounds.

2. A method as claimed in claim 1, wherein the increase is caused by treatment with acylcyclohexanediones such as prohexadione-calcium (II) and/or trinexapac-ethyl (III).



3. A method as claimed in any of claims 1 or 2, wherein the plants are grapevines, cherries, plums, sloes, blueberries, strawberries, citrus fruit (such as oranges, grapefruit), pawpaw, red cabbage, broccoli, Brussel sprouts, kale, carrots, parsley, celery/celeriac, onions, garlic, tea, coffee, cacao, maté, hops, soya, oilseed rape, oats, wheat, rye, *Aronia melanocarpa* and *Ginkgo biloba*.

4. The use of plants as claimed in claim 3 or of parts of these plants or of products prepared with them (juices, infusions, extracts, fermentation products and fermentation residues) for the preparation of curative compositions,
5 health-promoting compositions or tonics for humans and animals, and of cosmetics.
5. A composition prepared by a method as claimed in any of claims 1 - 3, wherein the grapes of red grapevines are
10 harvested and processed whose anthocyanin production has been prevented fully or partially by treatment with acylcyclohexanediones such as prohexadione-calcium or trinexapac-ethyl and which are therefore distinguished by a qualitatively and quantitatively increased content of
15 flavonoids and other phenolic constituents.
6. A composition as claimed in claim 5, the composition being grapes or parts of grapes, or juices, wines or residues obtained from pressing said grapes, or extracts of the
20 abovementioned grapes, parts of grapes or grape products.

25

30

35

40

45

1/4

Fig. 1

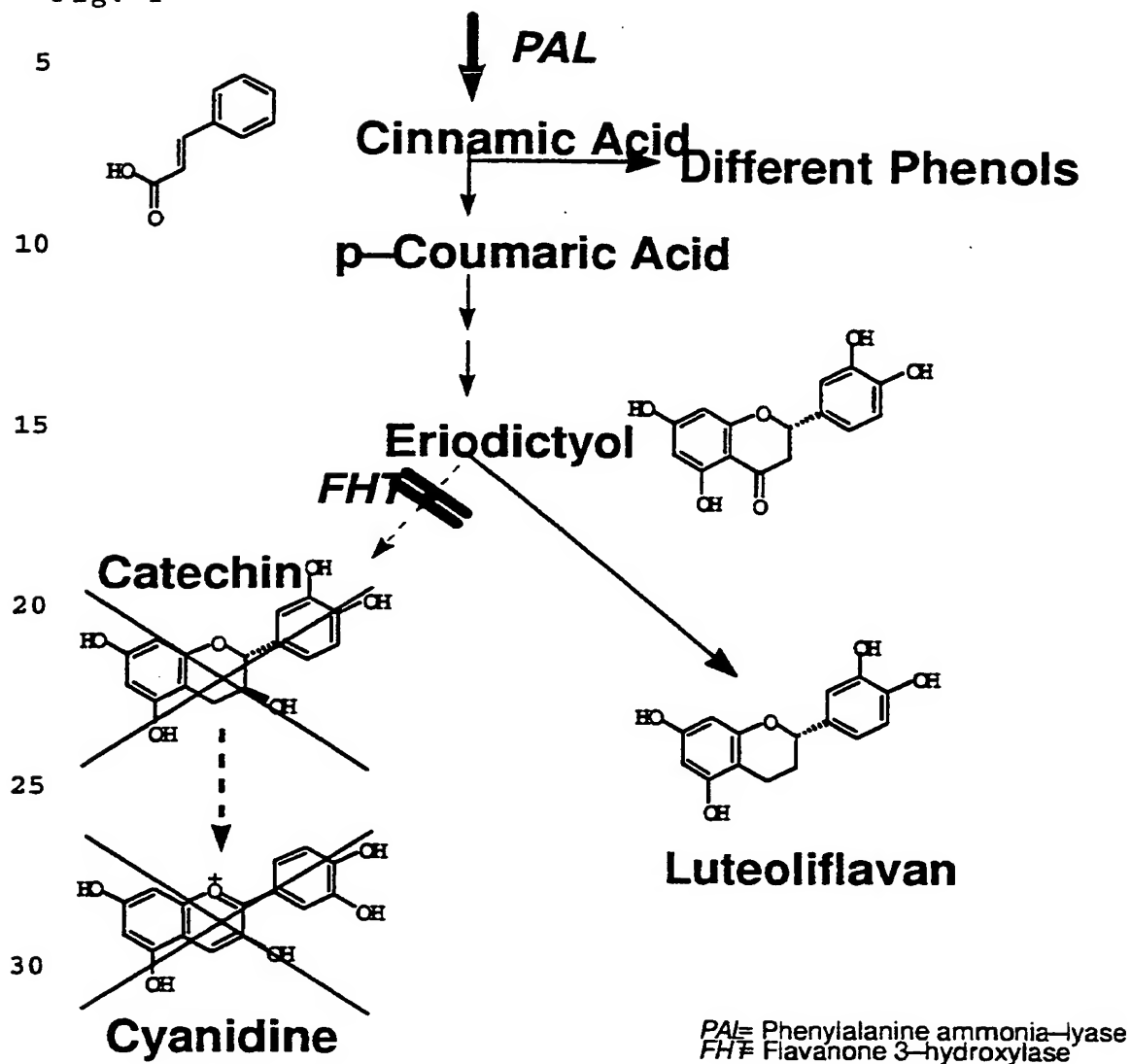


Fig.2

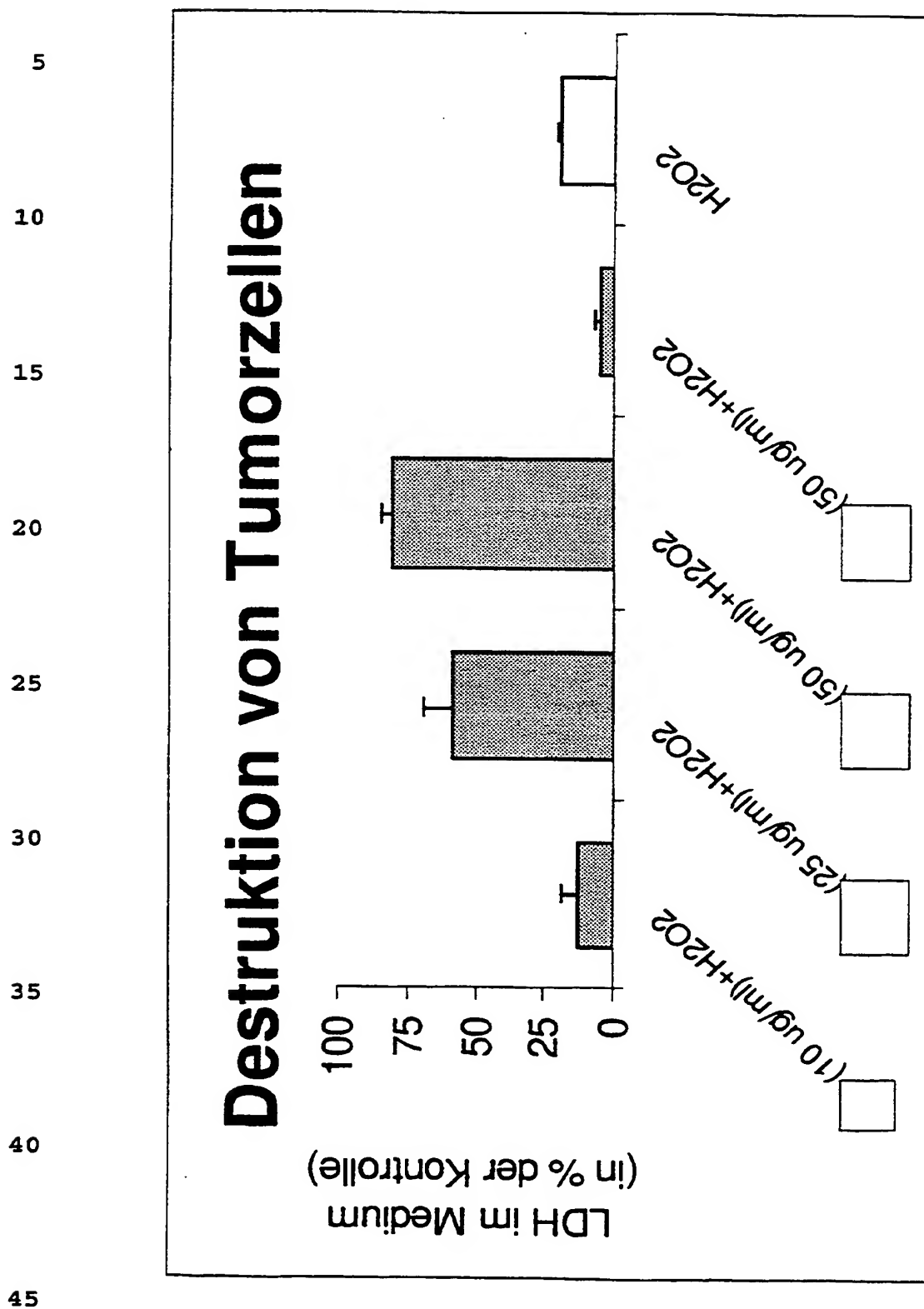


Fig. 3

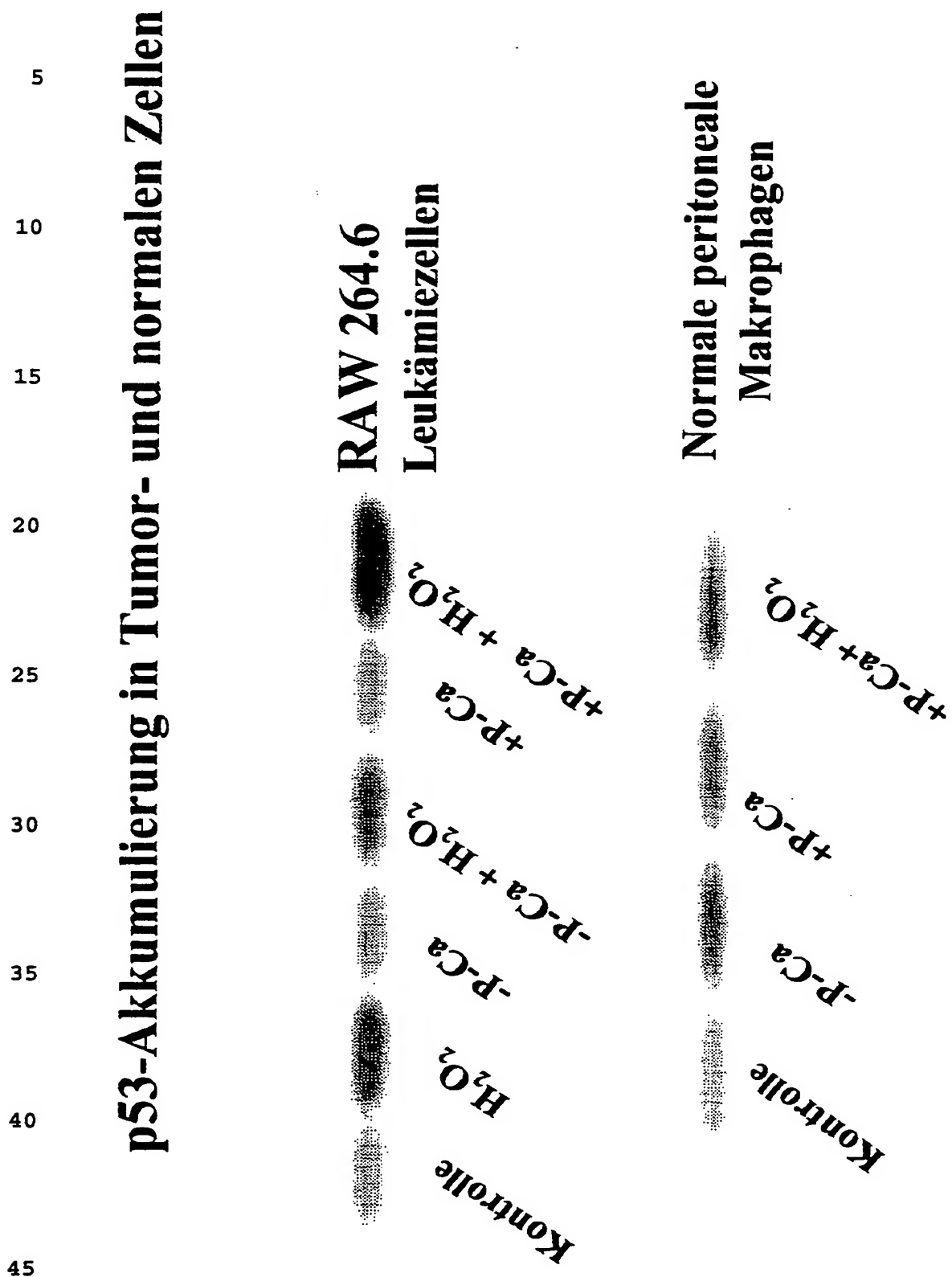
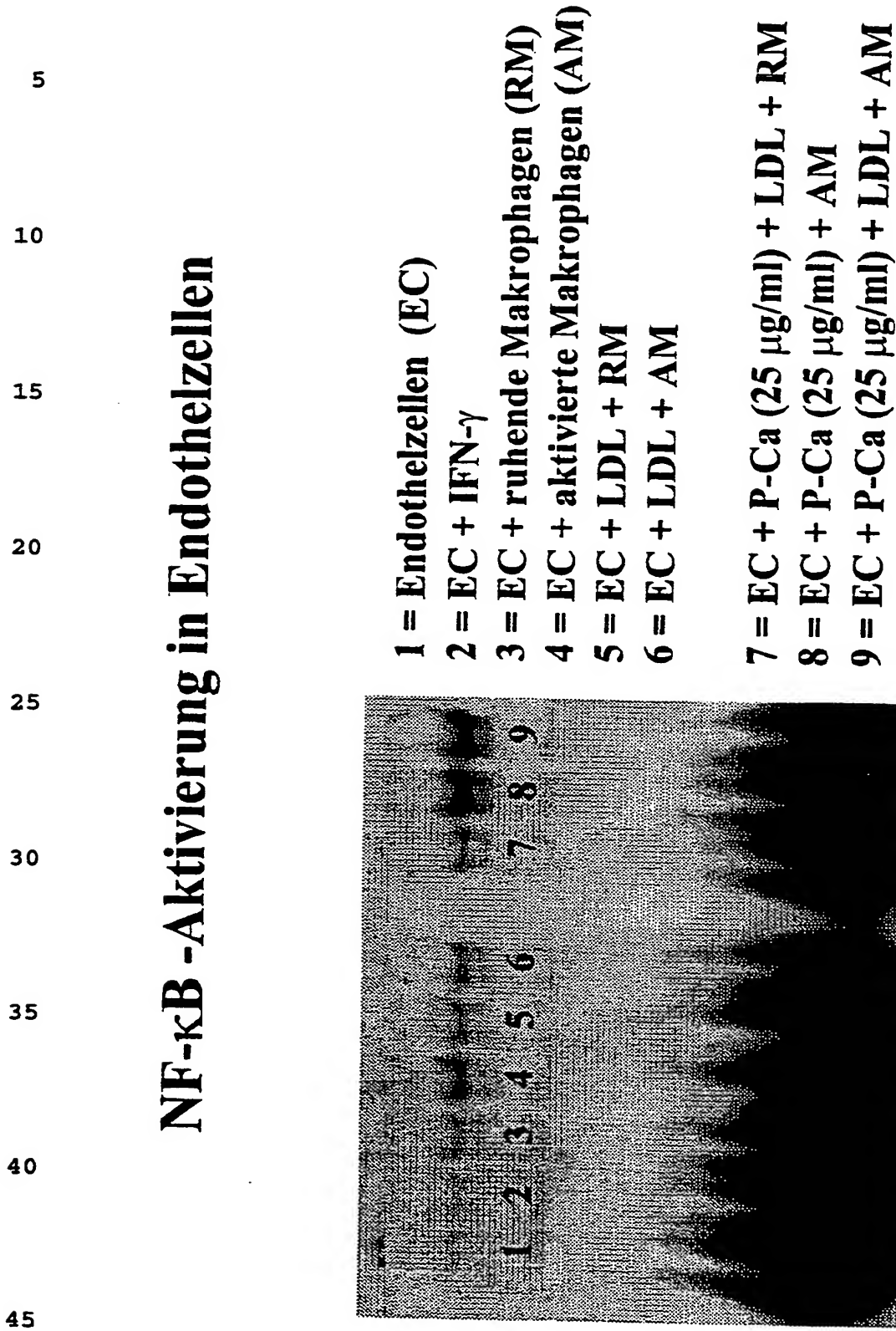


Fig. 4

NF-κB -Aktivierung in Endothelzellen



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/05258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01N37/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROEMMELT, S. ET AL: "Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple respect to plant resistance against fire blight" ACTA HORTIC. (1999), 489(EIGHTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON FIRE BLIGHT, 19, pages 359-363, XP000917326 cited in the application the whole document	1-6
X	RADEMACHER, WILHELM: "Inhibitors of gibberellin biosynthesis: Prohexadione-Ca, a new plant grow regulator for apple with interesting biochemical features" RIKEN REV., no. 21, April 1999 (1999-04), pages 11-12, XP000917297 the whole document	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 August 2000

Date of mailing of the international search report

23/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bertrand, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/05258

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 598 404 A (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO) 25 May 1994 (1994-05-25) the whole document	1-6
Y	FR 2 767 533 A (PASQUALE GERARD DI) 26 February 1999 (1999-02-26) the whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05258

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0598404 A	25-05-1994	JP 6157209 A	03-06-1994
		AT 169178 T	15-08-1998
		BR 9304763 A	24-05-1994
		CA 2103093 A	20-05-1994
		CN 1086955 A	25-05-1994
		DE 69320148 D	10-09-1998
		DE 69320148 T	10-12-1998
		ES 2119849 T	16-10-1998
		KR 172618 B	01-02-1999
		LT 1453 A,B	15-06-1994
		RU 2129370 C	27-04-1999
		US 5436225 A	25-07-1995
		US 5510321 A	23-04-1996
FR 2767533 A	26-02-1999	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05258

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 598 404 A (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO) 25. Mai 1994 (1994-05-25) das ganze Dokument	1-6
Y	FR 2 767 533 A (PASQUALE GERARD DI) 26. Februar 1999 (1999-02-26) das ganze Dokument	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/05258

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0598404	A	25-05-1994	JP	6157209 A	03-06-1994
			AT	169178 T	15-08-1998
			BR	9304763 A	24-05-1994
			CA	2103093 A	20-05-1994
			CN	1086955 A	25-05-1994
			DE	69320148 D	10-09-1998
			DE	69320148 T	10-12-1998
			ES	2119849 T	16-10-1998
			KR	172618 B	01-02-1999
			LT	1453 A,B	15-06-1994
			RU	2129370 C	27-04-1999
			US	5436225 A	25-07-1995
			US	5510321 A	23-04-1996
FR 2767533	A	26-02-1999	KEINE		

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Dezember 2000 (28.12.2000)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/78143 A1

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A01N 37/42

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05258

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 27 571.8 17. Juni 1999 (17.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RADEMACHER, Wilhelm [DE/DE]; Austrasse 1, D-67117 Limburgerhof (DE). KRÄMER, Klaus [DE/DE]; Daniel-Knobloch-Strasse 4, D-76829 Landau (DE). SCHWEDEN, Jürgen [DE/DE]; Heinrich-Strieffler-Strasse 19, D-67433 Neustadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

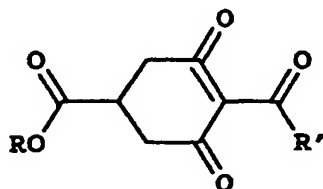
Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD OF INCREASING THE CONTENT OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC SUBSTANCES IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG VOM GEHALT AN FLAVONOIDEN UND PHENOLISCHEN INHALTSSTOFFEN IN PFLANZEN



(I)

(57) Abstract: The invention relates to a method of increasing the flavonoid content of plants by treating the plants with the growth-regulating acylcyclohexadiones according to formula (I).

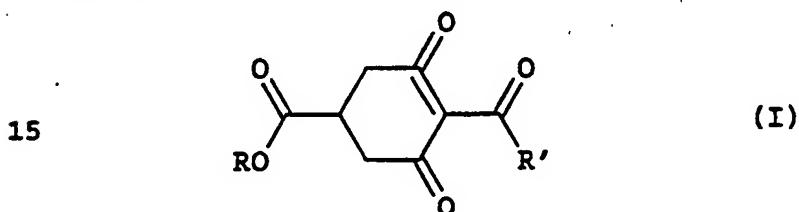
(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Erhöhung des Flavonoid-Gehalts in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen mit wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen gemäß Formel (I) behandelt werden.

WO 00/78143 A1

VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG VOM GEHALT AN FLAVONOIDEN UND PHENOLISCHEN INHALTSSTOFFEN IN PFLANZEN

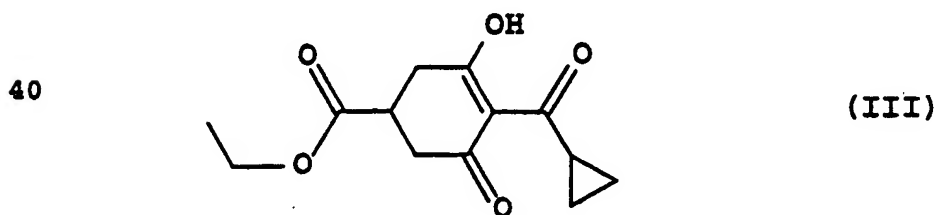
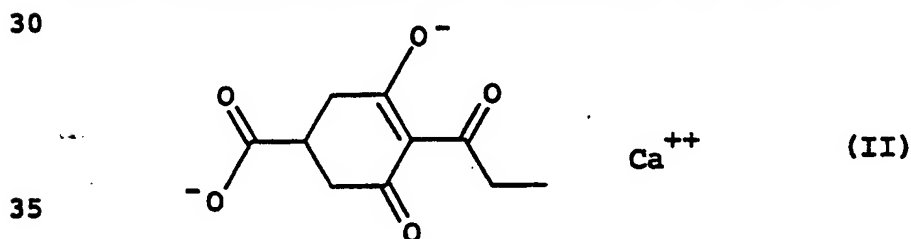
5 Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze mit
 10 wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen der Formel I behandelt werden,



wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-,
 20 C₁-C₆-Haloalkyl-, C₂-C₁₀-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienylmethyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete
 25 Salze dieser Verbindungen.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Erhöhung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(II) und/oder Trinexapac-ethyl(III) hervorgerufen werden.



45 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Acylcyclohexadionen der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder mit Trinexapac-

ethyl behandelt wurden oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.

- Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mittel, hergestellt nach den erfindungsgemäßen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.
- Verschiedene phenolische Substanzen (Phenylpropanoide) kommen in Pflanzen vor, z. B. Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, Gallussäure, Eugenol, Lignane, Cumarine, Lignin, Stilbene (Polydatin, Resveratrol), Flavonoide (Flavone, Catechine, Flavanone, Anthocyanidine, Isoflavone), polymethoxylierte Flavone. Demgemäß sind Phenole auch genereller Bestandteil vieler pflanzlicher Nahrungs- und Genußmittel. Bestimmte phenolische Substanzen sind von besonderer Bedeutung, da sie nach Aufnahme mit der Nahrung im menschlichen oder tierischen Stoffwechsel eine antioxidative Wirkung ausüben können (Baum, B. O.; Perun, A. L. Antioxidant efficiency versus structure. *Soc. Plast. Engrs Trans* 2: 250-257, (1962); Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Duthie, G.G. Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J. Sci. Food Agric.* 76: 257-262, (1997); Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Pananga, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956, (1996); Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. Polyphenolic flavonoids as scavenger of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339-346, (1995); Stryer, L. *Biochemistry* S. Francisco: Freeman, (1975); Vieira, O.; Escargueil-Blanc, I.; Meilhac, O.; Basile, J. P.; Laranjinha, J.; Almeida, L.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 123: 565-573, (1998)). Darüber hinaus haben Polyphenole vielfältige Wirkungen auf den Zellstoffwechsel. Unter anderem werden Enzyme der Signaltransduction wie Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase und Phosphatidylinositol-3-kinase moduliert (Agullo, G.; Gamet-payrastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Remesy, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a compari-

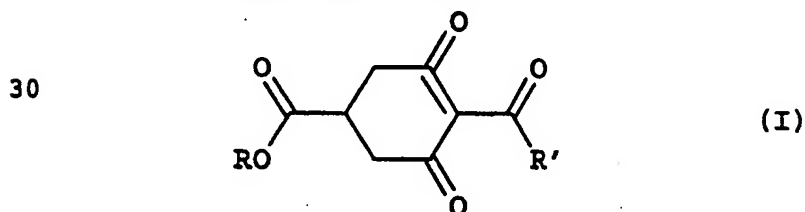
- son with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53 :1649-1657, (1997); Ferriola, P. C.; Cody, V.; Middleton, E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure activity relationship. *Biochem Pharmacol* 38: 1617-1624, (1989); Cushman, M.; Nagarathman, D.; Burg, D. L.; Geahlen, R. L. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of flavonoids analogues. *J Med Chem* 34: 798-806, (1991); Hagiwara, M.; Inoue, S.; Tanaka, T.; Nunoki, K.; Ito, M.; Hidaka, H. Differential effects of flavonoids as
- 5 inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem Pharmacol* 37: 2987-2992, (1988)), -die induzierbare NO-Synthase downreguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage
- 15 cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53: 897-903, (1997)) und die Genexpression von z. B. Interleukinen und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) reguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell
- 20 line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53:897-903, (1997); Wolle, J.; Hill, R. R.; Ferguson, E.; Devall, L. J.; Trivedi, B. K.; Newton, R. S.; Saxena, U. Selective inhibition of Tumor necrosis Factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcriptional factor NF-kB.
- 25 *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 16: 1501-1508, (1996)). Es gilt als gesichert, daß diese Wirkungen positiv sind zur Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes, verschiedener Tumorarten und weiterer chronischer Krankheiten (Bertuglia, S.; Malandrino, S.; Colantuoni, A. Effects of the natural flavonoid delphinidin
- 30 on diabetic microangiopathy. *Arznei-Forsch/Drug Res* 45: 481-485, (1995); Griffiths, K.; Adlercreutz, H.; Boyle, P.; Denis, L.; Nicholson, R.I.; Morton, M.S. *Nutrition and Cancer* Oxford: Isis Medical Media, (1996); Hertog, M. G. L.; Fesrens, E. J. M.; Hollman, P. C. K.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant
- 35 flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342: 1007-1011, (1993); Kapiotis, S.; Hermann, M.; Held, I.; Seelos, C.; Ehringer, H.; Gmeiner, B. M. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-74, (1997); Stampfer, M. J.; Hennekens, C. H.; Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Rosner, B.; Willet, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New Engl J Med* 328 :1444-1449, (1993); Tijburg, L. B. M.; Mattern, T.; Folts, J. D.; Weisgerber,
- 40 U. M.; Katan, M. B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 771-785, (1997); Kirk, E. A.; Sutherland, P.; Wang, S. A.; Chait, A.; LeBoeuf, R. C. Dietary

- isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128: 954-9, (1998)). Aus geeigneten Pflanzen wird daher bereits eine Reihe von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln gewonnen, deren Wirkung auf ihrem Gehalt an phenolischen Substanzen beruht (Gerritsen, M. E.; Carley, W. W.; Ranges, G. E.; Shen, C. P.; Phan, S. A.; Ligon, G. F.; Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278-292, (1995); Lin, J. K.; Chen, Y. C.; Huang, Y. T.; Lin-Shiau, S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 28-29:39-48, 1997; Zi, X.; Mukhtar, H.; Agarwal, R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. *Biochem Biophys Res Comm* 239:334-339, 1997). Bekannt ist weiterhin, daß bestimmte pflanzliche Nahrungsmittel oder aus ihnen hergestellte Genußmittel eine positive Wirkung gegen verschiedene Krankheiten ausüben. Das in Weißwein, besonders aber in Rotwein, enthaltene Resveratrol (nebst weiterer Komponenten) wirkt beispielsweise gegen kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Gehm, B.D.; McAndrews, J.M.; Chien, P.-Y.; Jameson, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143, (1997); Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehtha, R.G.; Moon, R.C., Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, (1997)). Eine ähnliche Wirkung weisen auch Substanzen wie Catechin, Epicatechin-3-gallat, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-gallat auf, die in Blättern von Tee (*Camellia sinensis*) vorkommen. Insbesondere aus nicht-fermentierten Teeblättern (Grüner Tee) hergestellte Getränke sind von positiver gesundheitlicher Relevanz (Hu, G.; Han, C.; Chen, J. Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallocatechin gallate in mice. *Nutr Cancer* 24: 203-209; (1995); Scholz, E.; Bertram, B. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Der Teestrauch. *Z. Phytotherapie* 17: 235-250, (1995); Yu, R.; Jiao, J. J.; Duh, J. L.; Gudehithlu, K.; Tan, T. H.; Kong, A. N. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant responsive elements-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 18: 451-456, (1997); Jankun, J.; Selman, S.H.; Swiercz, R. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387: 561, (1997)). Darüber hinaus weisen auch polymethoxylierte Flavone aus Zitrusfrüchten eine potentielle antitumorale Wirkung auf (Chem,

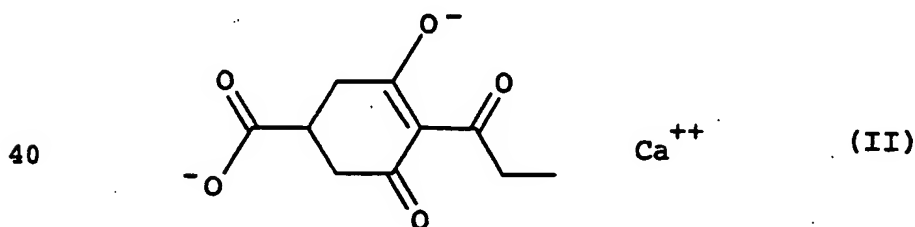
J.; Montanari, A.M.; Widmer, W.W. Two new polymethoxylierte flavone, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids. *J Agric Food Chem* 45: 364-368, (1997)).

- 5 Acylcyclohexadione wie Prohexadion-Ca und Trinexapac-ethyl (ältere Bezeichnung: Cimectacarb) werden als Bioregulatoren zur Hemmung des pflanzlichen Längenwachstums eingesetzt. Ihre bioregulatorische Wirkung kommt dadurch zustande, daß sie die Biosynthese von längenwachstumsfördernden Gibberellinen blockieren. Dabei hemmen sie aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu 2-Oxoglutarsäure bestimmte Dioxygenasen, die 2-Oxoglutarsäure als Co-Substrat benötigen (Rademacher, W, Biochemical effects of plant growth retardants, in: Plant Biochemical Regulators, Gausman, HW (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-200 (1991)). Es ist bekannt, daß derartige Verbindungen auch in den Stoffwechsel von Phenolen eingreifen und so bei mehreren Pflanzenarten eine Hemmung der Anthocyanbildung bewirken können (Rademacher, W et al., The mode of action of acylcyclohexanediones - a new type of growth retardant, in: Progress in Plant Growth Regulation, Karssen, CM, van Loon, LC, Vreugdenhil, D (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992)). Derartige Effekte auf den Haushalt phenolischer Inhaltsstoffe werden als ursächlich für die Nebenwirkung von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand angegeben (Rademacher, W et al., Prohexadione-Ca - a new plant growth regulator for apple with interesting biochemical features, Poster auf dem 25th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, 7.-10. Juli 1998, Chicago). A. Lux-Endrich (Dissertation Technische Universität München in Weihenstephan, 1998) findet im Verlauf ihrer Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand, daß es in Zellkulturen von Apfel durch Prohexadion-Ca zu einer mehrfachen Erhöhung des Gehaltes an phenolischen Substanzen kommt und daß dabei eine Reihe von sonst nicht vorhandenen Phenolen auftritt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde weiterhin gefunden, daß unter dem Einfluß von Prohexadion-Ca relativ hohe Mengen von Luteoliflavan und Eriodyctiol in Sproßgewebe von Apfel auftreten. Luteoliflavan kommt in Apfelgewebe normalerweise nicht vor und Eriodyctiol tritt als Intermediat des Flavonoidstoffwechsels nur in geringen Mengen auf. Die zu erwartenden Flavonoide Catechin und Cyanidin waren im behandelten Gewebe jedoch nicht nachweisbar oder traten nur in deutlich reduzierten Mengen auf (S. Römmelt et al, Vortrag 8th International Workshop on Fire Blight, Kusadasi, Türkei, 12.-15. Oktober 1998).

- Es kann als gesichert gelten, daß Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und andere Acylcyclohexadione 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen inhibieren, die im Stoffwechsel phenolischer Substanzen von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich primär um Chalconsynthetase (CHS) und um Flavanon-3-hydroxylase (F3H) (W. Heller und G. Forkmann, Biosynthesis, in: The Flavonoids, Harborne, JB (ed.), Chapman and Hall, New York, 1988). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Acylcyclohexadione auch weitere, bislang unbekannte, 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen hemmen. Es dürfte ferner naheliegend sein, daß ein Mangel an Catechin, Cyanidin oder anderen Endprodukten der Flavonoidsynthese von der Pflanze registriert wird und daß über einen Feedback-Mechanismus die Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) erhöht wird. Durch die weiterhin existierende Hemmung von CHS und F3H können diese Flavonoid-Endprodukte jedoch nicht gebildet werden, und es kommt zu einer vermehrten Bildung von Luteoliflavan, Eriodyctiol und anderer Phenole (Abbildung 1).
- 20 Aufgabe der Erfindung war es ein kostengünstiges, einfaches Verfahren zu entwickeln, um den Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen in Pflanzen zu erhöhen und um deren gesundheitsfördernden Eigenschaften zu verbessern.
- 25 Die Aufgabe konnte überraschenderweise durch Behandlung der Pflanzen mit den wachstumsregulierenden Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione(I)

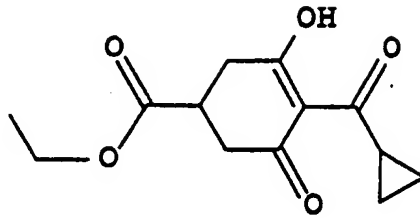


- 35 und vor allem mit den Verbindungen Prohexadion-Ca(II)



und Trihexapac-ethyl(III)

5



(III)

erreicht werden.

10

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) können die Flavonoide Eriodictyol, Proanthocyanidine, die am C-Atom 3 mit Wasserstoff substituiert sind, z.B. Luteoforol, Luteoliflavan, Apigeniflavan und Tricetiflavan, sowie homogene und heterogene Oligomere und Polymere aus den genannten und strukturell verwandten Substanzen vermehrt gebildet werden.

15

Erhöhte Konzentrationen der Phenole Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Salicylsäure oder Umbelliferon, einschließlich der aus ihnen gebildeten homogenen und heterogenen Oligomere und Polymere können nach Applikation der Verbindungen Acylcyclohexadion der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trihexapac-ethyl(III) auf Pflanzen festgestellt werden.

25

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) wird auch die Konzentration der Glykoside der Flavonoide, der phenolischen Verbindungen, der Chalcone und der Stilbene in den Pflanzen erhöht.

30

Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und verwandte Verbindungen greifen auch in weitere Stoffwechselreaktionen ein, bei denen bislang allenfalls vermutet werden kann, daß 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen beteiligt sind.

35

Als weitere zusätzlich positive Wirkung bei der Gewinnung von Präparaten aus höheren Pflanzen mit verbesserter heilender, gesundheitsfördernder oder stärkender Wirkung ist zu vermerken, daß sich aufgrund der wachstumsregulierenden Wirkung von Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl oder verwandter Acylcyclohexandione ein Konzentrierungseffekt der relevanten Inhaltsstoffe im biologischen Material ergibt.

40

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen durch Behandlung der Pflanzen mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione

45

- der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl, kann erfolgreich bei folgenden Pflanzen angewendet werden, wobei auch Pflanzen, die nicht genannt sind, erfolgreich behandelt werden können: Weinrebe, Kirsche, Pflaume, Schlehe, Blaubeere, Erdbeere,
- 5 Zitrusfrüchte (wie Orange, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, Aronia melanocarpa, Ginkgo biloba.
- 10 Pflanzen, die mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadione, speziell Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl, behandelt wurden zur Steigerung des Gehaltes an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen, oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermenta-
- 15 tionsprodukte und -rückstände) können zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika verwendet werden.

- Aus den erfindungsgemäß behandelten Pflanzen können auch Mittel
- 20 hergestellt werden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quanti-
- 25 tativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.

- Es wurde nun überraschend gefunden, daß unter dem Einfluß von mit Acylcyclohexadionen der Formel I, Prohexadion-Ca oder Trihexapac-
- 30 ethyl behandelten Pflanzen oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellter Produkte (Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte, Säfte etc.)

- (1) die Antioxidative Kapazität *in vitro* (Electron Spin Resonance (ESR), LDL-Oxidation, Total Antioxidant Capacity, NO-Scavenging) verbessert wird;
- 35
- (2) eine modulierende Wirkung auf Enzyme, vor allem Enzyme der Signaltransduktion (Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase) auftritt;
- 40
- (3) eine Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1) in Endothelzellen, Lymphocyten und glatten Muskelzellen induziert wird;
- 45

- (4) die Regulation der Genexpression von Targetgenen involviert in die Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen (Cytokine IL-1 und IL-8, *macrophage chemoattractant protein 1* (MCP-1), Adhensionsfaktoren ICAM-1 und VCAM-1) moduliert wird;
- 5 (5) eine antiaggregatorische Wirkung induziert wird;
- (6) die Cholesterinsynthese in Hepatocyten gehemmt wird;
- 10 (7) antiproliferative/antineoplastische Effekte bestehen.

Beispiel 1

Steigerung des Gehaltes an Eriodictyol und Luteoliflavan an jungen Apfelblättern nach Behandlung mit Prohexadion-Ca

Apfelpflanzen der Sorte "Weirouge" wurden unter Klimakammer-Bedingungen kultiviert und mit 250 ppm an Prohexadion-Ca (formuliert als BAS 125 10 W = 10 %iges benetzbares Granulat) bis

20 tropfnaß behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde von den einzelnen Trieben das jeweils jüngste vollentwickelte Blatt geerntet. Die gefriergetrockneten und gemörserten Blätter wurden mit Methanol extrahiert. Aus dem konzentrierten Extrakt wurden Flavonoide und verwandte Verbindungen durch HPLC

25 analysiert. Die Auftrennung erfolgte dabei an Hypersil ODS (3 µm Partikelgröße) auf einer Säule von 250 x 4 mm. Die Elution erfolgte bei einer Fließrate von 0,5 ml pro Minute, wobei Mischungen aus Ameisensäure (5 %ig in Wasser) und Methanol, schrittweise im Verhältnis von 95 : 5 bis 10 : 90 (v/v) gesteigert, verwendet wurden. Phenolische Säuren und Flavonole wurden

30 bei 280 nm detektiert. Flavan-3-ole wurden nach Nachsäulenderivatisierung mit p-Dimethylaminozimtaldehyd bei 640 nm bestimmt. Methodische Details bei Treutter et al. (1994), Journal of Chromatography A 667, 290 - 297.

35

Das Ergebnis ist in folgender Tabelle dargestellt:

Blätter, die mit Prohexadion-Ca behandelt wurden zeigen eine deutliche Erhöhung der Eriodictyol-Konzentration nach 12 bzw. 21

40 Tagen.

Behandlung	Eriodictyol [g/kg Trockenmasse]		Luteoliflavan [g/kg Trockenmasse]	
	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.
5 Kontrolle	0	1	0	70
250 ppm Prohexadion- Ca	17	27	0	34

10 Beispiel 2

Herstellung von Probenmaterialien aus behandelten und unbehandelten Dornfelder-Trauben

15 Rebstöcke der Sorte "Dornfelder" wurden zweimal zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Formulierung BAS 125 10W, enthaltend Prohexadion-Ca behandelt. Je Behandlung wurden 1000 g Prohexadion-Ca in 1000 l Spritzbrühe pro ha appliziert.

20 Die 1. Ausbringung erfolgte im Entwicklungsstadium 73 noch vor Beginn der Beerenausfärbung, die 2. Ausbringung 10 Tage später.

Bei der Ernte wiesen die unbehandelten und die behandelten Trauben einer ähnlichen Reifegrad auf. Kontrolle unbehandelt: 69°C Oe;

25 7,3 g/l Säurebehandelt: 67°C Oe; 7,4 g/l Säure.

Die behandelten Trauben waren geringer pigmentiert. Geschmacklich war kein Unterschied feststellbar.

30 Der Weinausbau erfolgte nach gängigen Methoden als Rotwein, d.h. zur besseren Pigmentextraktion stand der Most längere Zeit auf der Maische.

35 Nach Gefriertrocknung des trübungsfreien Weins wurden aus 100 ml unbehandeltem Wein ca. 2,5 g sirupartiger Rückstand und aus dem mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken gewonnenen Wein ca. 2,1 g sirupartiger Rückstand gewonnen.

Beispiel 3

40 Hemmung der Cholesterinbiosynthese in Kulturen primärer Rattenhepatocyten durch Prohexadion-Ca behandelten Dornfelder Wein

Herstellung der Stammlösungen

Vom Lyophilisat der unbehandelten und behandelten Dornfelder Weine wurde eine Menge zwischen 10 und 20 mg exakt abgewogen und 5 mit soviel DMSO versetzt, daß eine Stammlösung von 10 mM Gesamtflavonoide entstand. Von diesen Stammlösungen wurden unmittelbar vor Testbeginn Verdünnungen im Kulturmedium hergestellt. Die Verdünnungen erfolgten in 10er Schritten zwischen 10^{-4} und 10^{-6} M.

10 Herstellung der Hepatocytenkulturen

Primäre Hepatocyten wurden aus den Lebern von männlichen Sprague-Dawley Ratten (240-290 g) mittels Collagenase-Perfusion gewonnen (Gebhardt et al., Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 41: 800 -804 15 (1991) 1990). Die Kultivierung erfolgte in Collagen-beschichteten Petrischalen (6-well Plates, Greiner, Nürtingen) mit einer Zelldichte von 125.000 Zellen/cm² in Williams Medium E mit 10 % Kälberserum. Nähere Angaben insbesondere zum Kulturmedium finden sich bei Gebhardt et al., Cell Biol. Toxicol. 6: 369 - 372 20 (1990) und Mewes et al., Cancer Res. 53: 5135 - 5142 (1993). Die Kulturen wurden nach 2 h auf serum-freies Medium mit Zusatz von 0,1 µM Insulin gewechselt. Sie wurden nach weiteren 20 h für die Versuche eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in je drei unabhängigen Kulturen von 2-3 Ratten getestet.

25

Inkubation der Leberzellkulturen mit den Testsubstanzen

Für den Nachweis einer Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese durch die Testsubstanzen wurden die Hepatocytenkulturen insgesamt 30 für 22 h gehalten. Anschließend wurde mit serum-freiem Williams Medium E unter Zusatz von ¹⁴C-Acetat (nur Tracermengen) für 2 h mit den Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei jeder Testserie wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die Methodik ist bei Gebhardt (1991) und Gebhardt, Lipids 28: 613 35 -619 (1993) detailliert beschrieben. Die Tracermengen von ¹⁴C-Acetat tauschen schnell mit dem intrazellulären Acetyl-CoA Pool aus und ermöglichen deshalb eine störungsfreie Bestimmung des Einbaus von ¹⁴C-Acetat in die Sterolfraction, die zu >90 % aus Cholesterin besteht (Gebhardt, 1993).

40

Analytik zur Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese

Der Einbau von ¹⁴C-Acetat in die Sterolfraction (nicht-verseifbare Lipide) wurde nach Gebhardt (1991) gemessen. Bei der verwendeten 45 Extraktion mittels Extrelut[®]-Säulen (Merck, Darmstadt) wird das ¹⁴C-Acetat (und daraus in geringer Menge entstehende andere niedermolekulare Metabolite) zu mehr als 95 % abgetrennt. Dieser

Test kann vergleichende Angaben über die relative Syntheserate von Cholesterin und Vorläufer-Sterolen unter dem Einfluss von Testsubstanzen machen (Gebhardt, 1993).

5 Visuelle und mikrobielle Überprüfung der Qualität der Hepatocytenkulturen

Alle verwendeten Kulturen wurden vor und nach der Testinkubation visuell am Mikroskop auf Kontamination mit Mikroorganismen und
10 auf die Integrität der Zellmonolayer überprüft. Bei keiner der Proben wurde eine erkennbare Veränderung der Zellmorphologie (insbesondere bei den höheren Konzentrationen) beobachtet. Dies schließt eine Beeinflussung der Testergebnisse durch zytotoxische Wirkungen der Testsubstanzen weitgehend aus.

15

Die bei allen Kulturen routinemäßig durchgeführten Sterilitätstests ergaben keinerlei Hinweise auf eine Kontamination mit Mikroorganismen.

20 Ergebnisse

Der unbehandelte Dornfelder Wein zeigte keinerlei Wirkungen auf die Cholesterinbiosynthese. Dagegen wurde die Cholesterinsynthese durch Proben von mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken herge-
25 stellten Wein signifikant inhibiert. Bei einer Konzentration von 10^{-5} M betrug die Hemmwirkung ca. 60 % und bei 10^{-4} M annähernd 100 %.

Beispiel 4

30

Effekt von Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt (P-Ca) auf die Destruktion von Tumorzellen

Konfluente murine Leukämiezellen (RAW 264.7) und normale Makro-
35 phagen aus dem Peritoneum von Ratten wurden in mit foetalem Kälberserum supplementiertem DMEM-Medium kultiviert. Extrakte von unbehandeltem und mit Prohexadion-Ca behandeltem Wein wurden bis zu einer Dosierung von 200 µg/mL dem Kulturmedium zugesetzt. In Parallelexperimenten wurden 10, 25 und 50 µg/mL Weinextrakt ge-
40 meinsam mit 100 µM H_2O_2 inkubiert.

Weinextrakt von mit Prohexadion-Ca-behandeltem Wein hatte per se bis zu einer Dosierung von 200 µg/mL keinen cytotoxischen Effekt auf die untersuchten Zellkulturen. Jedoch verstärkte Prohexadion-
45 Ca-behandelter Extrakt nach Zugabe von H_2O_2 dosisabhängig den Zelltod der Tumorzellen (RAW 264.7). Dies wird in Abbildung 2 durch die Zunahme des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase

(LDH) im Kulturmedium dokumentiert. Keine Erhöhung der cytotoxischen Wirkung von H_2O_2 trat bei den nicht-transformierten Makrophagen auf. Bei der Tumorzelllinie trat eine Akkumulation des Proteins vom Tumorsuppressorgen p53 im Cytoplasma auf, siehe Abbildung 3.

Prohexadion-behandelter Weinextrakt erhöht die H_2O_2 -induzierte Cytotoxizität von Leukämiezellen, ist aber nicht bei normalen Makrophagen wirksam. Dieser für Tumorzellen spezifische Effekt tritt auch bei Cytostatika auf, die über vermehrten oxidativen Stress wirken (z.B. Anthracycline). Der Mechanismus von Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt ist p53-abhängig.

Beispiel 5

15

Effekt von Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt auf die NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen

Die Untersuchung wurde in Cokulturen aus Makrophagen (RAW 264.7) und Endothelzellen (ECV 304) durchgeführt. Dem Kulturmedium der Endothelzellen wurde humanes LDL (Lipoproteine niedriger Dichte) und ruhende bzw. Interferon- γ (IFN- γ)-aktivierte (10 U/mL) Makrophagen zugegeben. Nach 16 h Inkubation wurde die nukleäre Proteinfraction abgetrennt und in elektrophoretischen Mobility Shift Assays die DNA-Bindung (Aktivierung) des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B bestimmt.

Der basale Gehalt in den ruhenden Endothelzellen war typischerweise gering, siehe Abbildung 4. Die Zugabe von LDL hatte eine Aktivierung des NF- κ B zur Folge, die bei aktivierten Makrophagen höher war als bei den ruhenden. Dies entspricht einer physiologischen Oxidation der LDL bei der Atherogenese. Durch die Inkubation mit Prohexadion-Ca-behandeltem Weinextrakt war die NF- κ B-Aktivierung in allen Fällen erhöht.

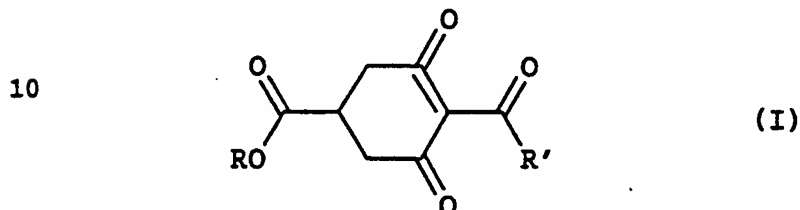
35

Das verwendete Zellkulturmodell ist sehr gut geeignet, die pathophysiologischen/ inflammatorischen Bedingungen in der frühen Phase der Atherosklerose zu beschreiben. Durch den Prohexadion-Ca-behandelten Weinextrakt wird die NF- κ B-Aktivierung verstärkt. Dies kommt der Wirkung eines Biological Response Modifiers gleich; d.h. die Zellantwort auf ein pathophysiologisches Signal wird im positiven Sinne verstärkt.

45

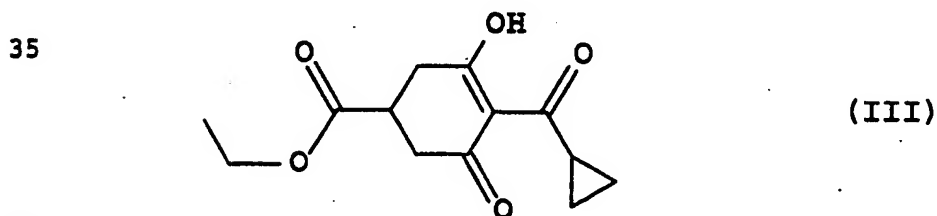
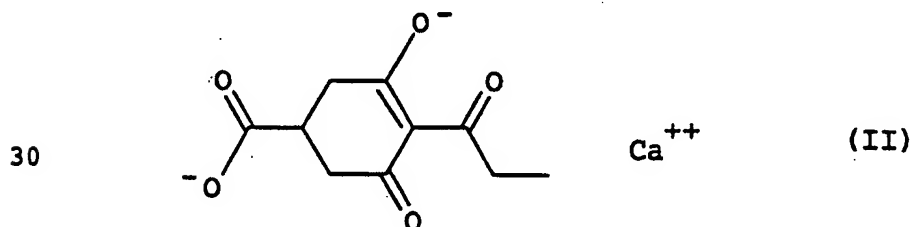
Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze mit wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen der Formel I behandelt werden,



- 15 wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Haloalkyl-, C₂-C₁₀-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C₁-C₆-Alkyl-, C₃-C₆-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienylmethyl-, Alkoxymethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie geeignete Salze dieser Verbindungen.
- 20

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Erhöhung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(II) und/oder Trinexapac-ethyl(III) hervorgerufen werden.
- 25



3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Pflanzen um Weinrebe, Kirsche, Pflaume, Schlehe, Blaubeere, Erdbeere, Zitrusfrüchte (wie Orange, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch,
- 45

Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, *Aronia melanocarpa*, *Ginkgo biloba* handelt.

4. Verwendung von Pflanzen gemäß Anspruch 3 oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.
- 10 5. Mittel, hergestellt nach Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist
- 15 und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.
- 20 6. Mittel gemäß Anspruch 5, bei denen es sich um Trauben oder Traubenteile, aus ihnen gewonnene Säfte, Weine oder Preßrückstände handelt oder um Extrakte aus den vorgenannten Trauben, Traubenteilen oder Traubenprodukten.

25

30

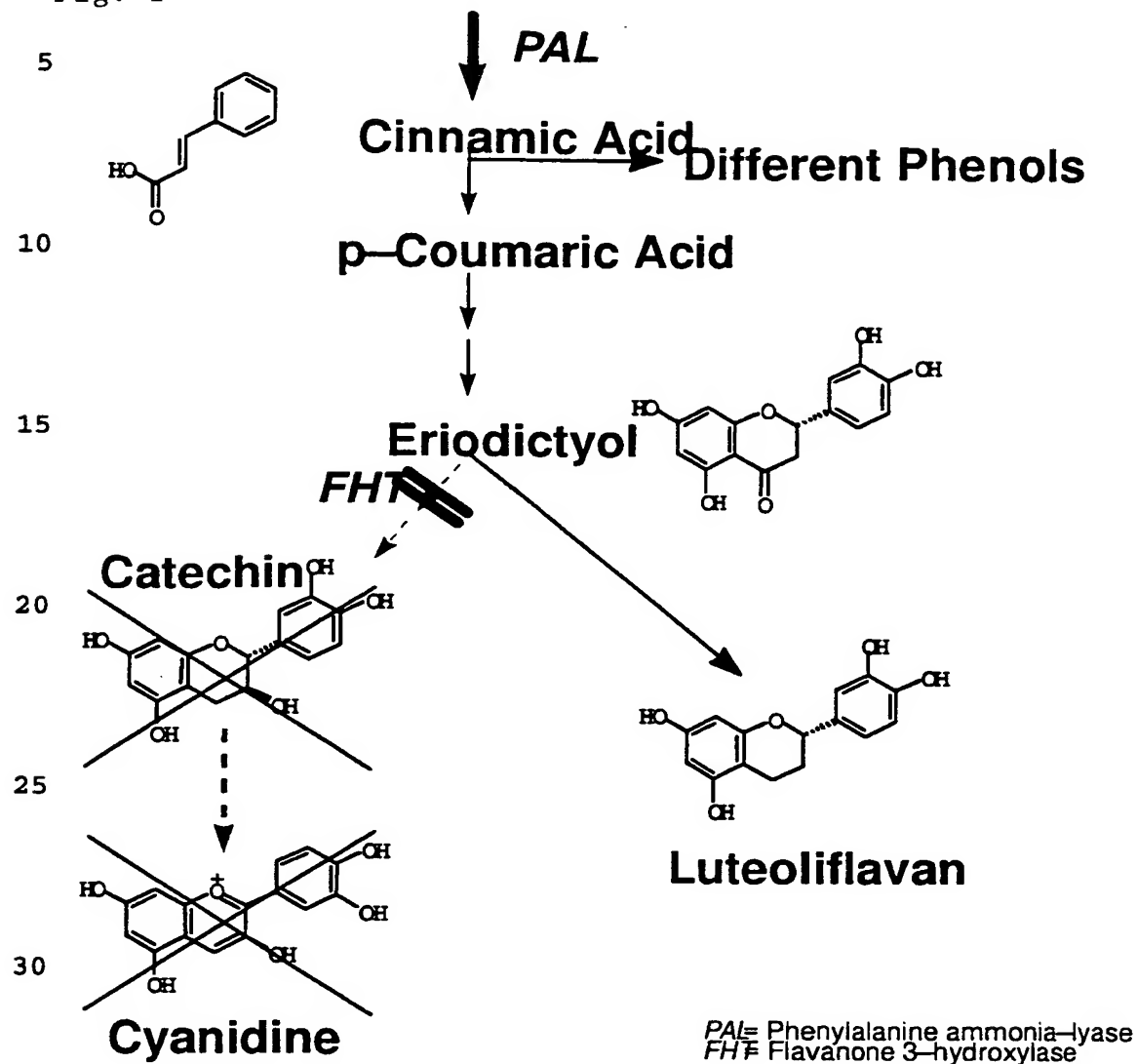
35

40

45

1/4

Fig. 1



2/4

Fig. 2

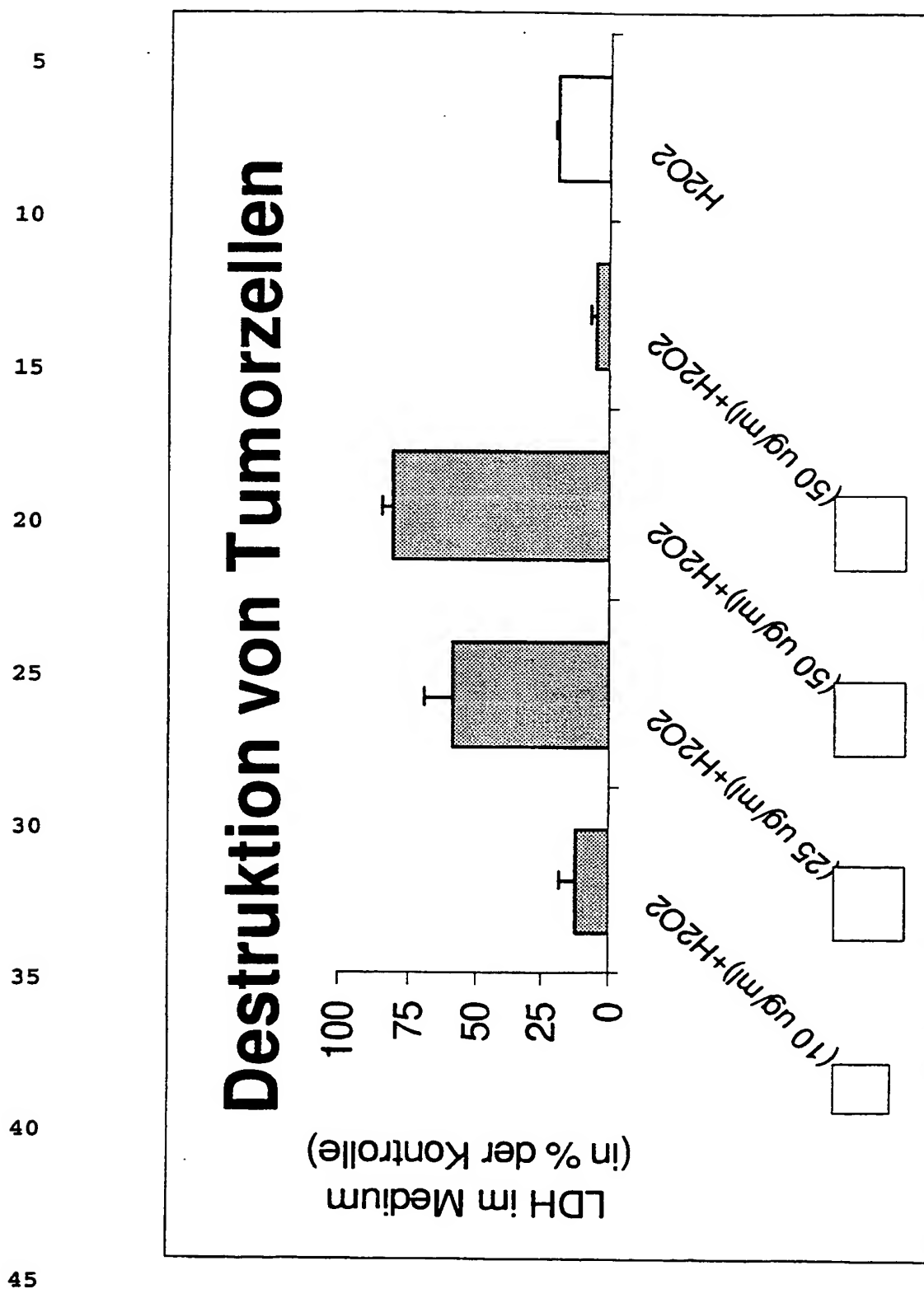


Fig. 3

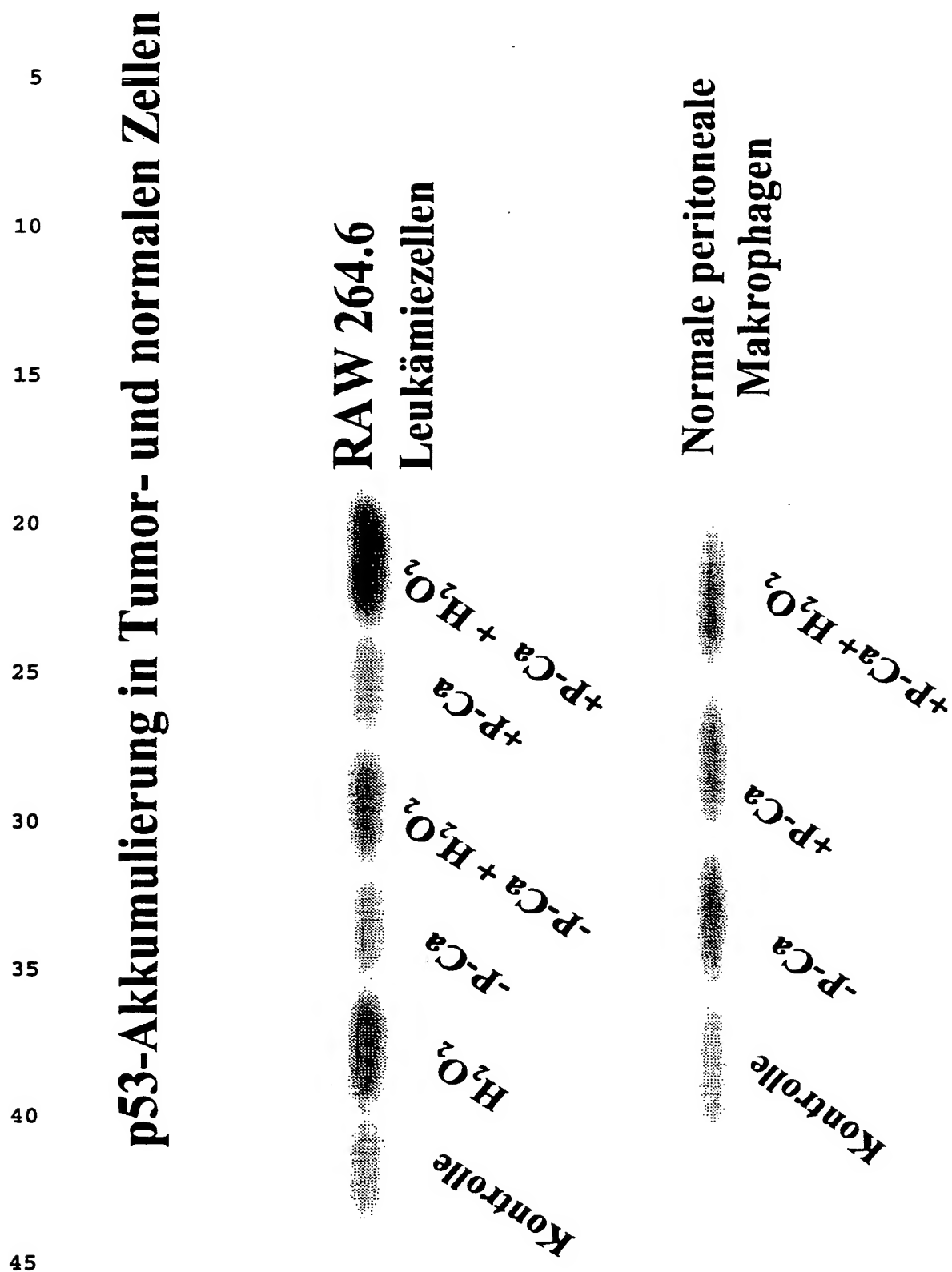


Fig. 4

NF- κ B -Aktivierung in Endothelzellen

